

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA CHAIM MATTOS

***NEOSPORA CANINUM* EM CANÍDEOS SELVAGENS**

CURITIBA

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA CHAIM MATTOS

***NEOSPORA CANINUM* EM CANÍDEOS SELVAGENS**

CURITIBA

2009

BIANCA CHAIM MATTOS

***NEOSPORA CANINUM* EM CANÍDEOS SELVAGENS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosângela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "*Neospora caninum* EM CANÍDEOS SELVAGENS, apresentada pela Mestranda Bianca Chaim Mattos declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 19 de fevereiro de 2009

Prof.ª Dr.ª Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Prof. Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Membro

Prof. Dr. Rogério Saad Vaz
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por trazer o Sol que me faz acordar feliz todas as manhãs.

À minha mãe e ao meu pai, que sempre acreditaram mais em mim do que neles. Por mais que tenham sempre incentivado meu desenvolvimento no mundo formal do conhecimento, tem coisas na vida que só se aprende com os pais. E em mim, foram essas as mais importantes.

Aos animais (em especial os selvagens do meu coração!), que nos lembram a importância da humildade cada vez que nos mostram suas inteligências diferentes e maiores que as nossas, e mesmo assim ainda permitem nos sentirmos seus defensores.

À minha família, por me mostrar desde que nasci que amor não conhece distância.

À Professora Rosângela Locatelli Dittrich, minha doce orientadora, por todos os ensinamentos e paciência, por me dar credibilidade mesmo quando tive que mudar de cidade, e por provar que não é necessário ser tirano para conseguir resultados e que sobrecarga de trabalho não é desculpa para mau humor!

Ao Professor Rogério Ribas Lange, meu mestre, que me ajudou sobremaneira na coleta das amostras e que tanto me ensinou de medicina de animais selvagens e de vários outros temas em suas loooongas conversas! Serei sempre sua discípula!

Às Médicas Veterinárias do Centro Diagnóstico Marcos Enrietti (Cidinha, Mara, Marielza, Regina e Rosária), por todo apoio na realização dos exames e tempo dispensado para me ajudar.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do HV-UFPR (Lia, Nina, Kemmy, Olair, Louise), Laboratório de Citogenética Humana da UFPR (Super Constanza!), Zoológico de Pomerode (Marcos Vinícius), Zoológico de Curitiba e Cetas-PUC/PR (Grazi), por tudo o que me ensinaram, pelo apoio, pela amizade e pela quebra de vários galhos!

Aos meus sócios e amigos da Vida Livre – Medicina de Animais Selvagens, que me ensinaram a ser gente grande (nem tão grande...), a entender o valor das diferenças, por superarem paradigmas e por mostrar ao mundo que nosso ideal é possível e está acima de todas as intempéries. Agora estou buscando salvar nossos amigos selvagens em outra esfera, mas estaremos sempre juntos e no mesmo barco!

A todos os meus queridos amigos da veterinária (nem vou colocar os nomes porque felizmente a lista é grande!), que fizeram da graduação a melhor época da minha vida e que continuam fazendo parte dela. Cada um seguiu seu rumo, mas a amizade continua cada vez mais forte e a parte boa é que temos pousos espalhados pelo Brasil!

À minha nova família de Brasília, que me apoiou na fase final e mais crítica da dissertação. Se não tivesse encontrado vocês, a barreira de se adaptar a uma cidade, um emprego e uma vida nova justamente na última etapa do mestrado, teria sido quase intransponível.

*“Se um homem marcha com um passo diferente do dos seus
companheiros, é porque ouve outro tambor.”*

Henry Thoreau

RESUMO

A neosporose, doença causada pelo protozoário *Neospora caninum*, está amplamente disseminada em espécies domésticas e selvagens. A preocupação com esta protozoose é principalmente devido ao grande número de abortos em rebanhos bovinos e a doença neurológica, muitas vezes fatal, em cães. O *N. caninum* possui ciclo heteroxeno e seus hospedeiros definitivos são os cães e os coiotes (*Canis latrans*). O presente estudo contém uma revisão bibliográfica da neosporose nas principais espécies, com destaque para as espécies selvagens, e dois capítulos com estudos inéditos. No primeiro capítulo está o estudo da frequência de anticorpos anti-*N.caninum* e anti-*T.gondii* em canídeos selvagens cativos (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*) de diferentes estados brasileiros (PR, SC, RJ e DF). A soroprevalência total obtida para *N. caninum* foi de 36% (18/50) e para *T. gondii* foi de 40% (20/50), demonstrando a presença deste parasito em canídeos selvagens cativos no Brasil. No capítulo II está descrito o estudo do diagnóstico parasitológico de fezes de três espécies de canídeos selvagens cativos (*Cerdocyon thous*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*) e o diagnóstico molecular. Foram realizadas a pesquisa de oocistos, a extração de DNA de fezes e a identificação das amostras pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram encontrados oocistos morfológicamente semelhantes aos de *N. caninum* em 7,5% (3/40) das amostras e foi encontrado DNA de *N. caninum* nas fezes de um lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), residente do Zoológico de Curitiba – PR. Com base nestes resultados, sugere-se a continuidade de pesquisas que enfoquem tentativas de identificação de outros hospedeiros definitivos de *N. caninum*, participação dos animais selvagens no ciclo da neosporose e epidemiologia molecular do parasito.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*, canídeos selvagens, oocistos.

ABSTRACT

Neosporosis, a disease caused by the protozoan *Neospora caninum*, is largely disseminated in domestic and wild species. The large number of abortions in cattle is the main concern of this protozoosis, besides the fatal neurological disease in dogs. *Neospora caninum* has a heteroxen cycle and its definitive hosts are dogs and coyotes (*Canis latrans*). In this work, there are a review of neosporosis in the main species, especially wild species, and two chapters with original research papers. The first chapter contains the study of frequency of antibodies anti-*N. Caninum* and anti-*T.gondii* in captive wild canids (*Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, *Speothos venaticus* and *Chrysocyon brachyurus*) from several Brazilian states (PR, SC, RJ and DF). The total seroprevalence of *N. caninum* was 36% (18/50) and of *T. gondii* was 40% (20/50), what shows the presence of this parasite in Brazilian captive wild canids. In chapter II parasitological and molecular diagnosis of faecal samples from three species of wild canids (*Cerdocyon thous*, *Speothos venaticus* e *Chrysocyon brachyurus*) are described. Oocysts morphologically related to *N. caninum* were found in 7.5% (3/40) samples and DNA of *N. caninum* was found in faeces of a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) from Curitiba Zoo. Based on these results, it is important to continue to identify other potencial definitive hosts of *N. caninum*, investigate the participation of wild animals in the neosporosis cycle and study the molecular epidemiology of the parasite.

KEY-WORDS: *Neospora caninum*, wild canids, oocysts.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 OBJETIVOS GERAIS.....	14
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 NEOSPOROSE EM BOVINOS	15
5 NEOSPOROSE EM CÃES	16
6 <i>Neospora caninum</i> EM ANIMAIS SELVAGENS	17
6.1 NEOSPOROSE EM ANIMAIS SELVAGENS NO MUNDO	18
6.1.1 Carnívoros	19
6.1.2 Não - carnívoros	19
6.1.3 Canídeos	20
6.2 NEOSPOROSE EM ANIMAIS SELVAGENS NO BRASIL.....	21
6.3 DIAGNÓSTICO	22
6.3.1 Diagnóstico Sorológico	22
6.3.2 Diagnóstico Coproparasitológico.....	23
6.3.3 Diagnóstico Molecular	23
6.3.4 Diagnóstico Histopatológico.....	24
6.3.5 Diagnóstico Imunohistoquímico.....	24
6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO I – SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Neospora caninum</i> E ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> EM CANÍDEOS SELVAGENS CATIVOS	39
ABSTRACT	39
RESUMO	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4 CONCLUSÕES	48
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO II – PESQUISA DE OOCISTOS DE <i>Neospora caninum</i> NAS FEZES DE TRÊS ESPÉCIES DE CANÍDEOS SELVAGENS NATIVAS DO BRASIL	53
ABSTRACT	53
RESUMO	54

1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Animais e Espécies	55
2.2 Procedência	56
2.3 Amostras	56
2.4 Exames Coproparasitológicos	56
2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	56
2.5.1 Extração do DNA	57
2.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Exames Coproparasitológicos	58
3.2 Caracterização dos oocistos de protozoários pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	60
4 CONCLUSÕES	65
5 PERSPECTIVAS	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

O *Neospora caninum* é um protozoário pertencente ao *phylum* Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 2002). Foi identificado em 1984 (DUBEY *et al.*, 1988), sendo anteriormente classificado como *Toxoplasma gondii* por suas similaridades taxonômicas. Seu ciclo de vida, no entanto, só foi elucidado em 1998 por McAllister e colaboradores (MCALLISTER *et al.*, 1998). É parasita intracelular obrigatório e possui um ciclo heteroxeno, sendo transmitido também por via vertical. A neosporose é uma das principais causas de abortos e natimortos no gado bovino em todo o mundo, sendo responsável por grandes perdas econômicas (DUBEY *et al.*, 2007).

Neospora caninum possui três formas de vida em seu ciclo: os taquizoítos e os cistos contendo bradizoítos, que podem ser encontrados nos tecidos dos hospedeiros intermediários, e os oocistos, que são a forma de resistência, excretados pelos hospedeiros definitivos após a fase sexuada de reprodução dos parasitos e são encontrados no ambiente (DUBEY *et al.*, 2007). Os hospedeiros intermediários contaminam-se ingerindo oocistos esporulados do parasito que foram eliminados no ambiente pelos hospedeiros definitivos. Estes, por sua vez, ingerem carcaças, fetos e restos de placentas contaminados. Nos hospedeiros definitivos ocorre a fase reprodutiva do parasito, o que origina os oocistos que serão eliminados no ambiente, completando assim o ciclo de transmissão horizontal. A transmissão horizontal é de notável importância, pois se estima que um único hospedeiro definitivo seja capaz de eliminar aproximadamente 500.000 oocistos após a ingestão de uma única carcaça contaminada, o que seria suficiente para infectar milhares de animais em um rebanho (GONDIM *et al.*, 2002). Todavia, a quantidade e frequência de eliminação de oocistos pelos hospedeiros definitivos não são constantes e estudos têm apresentado resultados bastante diferentes desses parâmetros (LINDSAY *et al.*, 2001a; SLAPETA, *et al.*, 2002a).

Diversas espécies de animais domésticos e não domésticos podem atuar como hospedeiros intermediários do *N. caninum*, como os cães, os bovinos, ovinos, caprinos, eqüinos, búfalos, cervos, ratos silvestres (*Rattus norvegicus*) e as raposas (*Vulpes vulpes*) (ANDERSON *et al.*, 2000; ALMERIA *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2004). Os hospedeiros definitivos já identificados são os cães e os coiotes (MCALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004). Os coiotes foram identificados como hospedeiros definitivos em 2004, nos Estados Unidos, (GONDIM *et al.*, 2004) e desde então

pesquisadores do mundo inteiro investigam a participação de animais selvagens no ciclo da neosporose.

O *Neospora caninum* está amplamente disseminado entre várias espécies de animais selvagens no mundo, conforme demonstram diversas pesquisas. Nos Estados Unidos, foi evidenciada associação entre a soroprevalência de *N. caninum* em bovinos e a presença de coiotes próximo às fazendas de gado (BARLING *et al.*, 2000). Gondim e colaboradores demonstraram experimentalmente que existe a possibilidade de transmissão do parasito entre espécies domésticas e selvagens (cães, coiotes, cervos e vacas) (GONDIM *et al.*, 2004a). A importância dos animais silvestres no ciclo da neosporose, no entanto, ainda carece de maiores estudos.

Houve sucesso na infecção experimental de dois macacos rhesus por *Neospora caninum*, o que levou a crer que existe possibilidade de infecção em seres humanos (BARR *et al.*, 1994). Poucos estudos foram feitos a respeito do potencial zoonótico da neosporose. No ano de 2006, Lobato *et al.* realizaram uma pesquisa de imunoglobulinas G anti-*N. caninum* em diferentes grupos de pacientes humanos e encontraram uma predominância em pacientes imunocomprometidos ou com distúrbios neurológicos (LOBATO *et al.*, 2006). O parasito ainda não foi isolado de tecidos humanos (DUBEY *et al.*, 2007). São necessários mais estudos para o esclarecimento completo da possibilidade de infecção por *Neospora caninum* em seres humanos.

O presente estudo fará inicialmente uma breve abordagem sobre a neosporose em bovinos e cães, que são as espécies mais estudadas, e em seguida será apresentada uma revisão bibliográfica sobre *Neospora caninum* em animais selvagens. Posteriormente, serão apresentados dois artigos científicos com os resultados das pesquisas realizadas.

2 OBJETIVOS GERAIS

- ◆ Determinar a soroprevalência de *Neospora caninum* em canídeos selvagens.
- ◆ Realizar diagnóstico parasitológico para presença e prevalência de *Neospora caninum* em canídeos selvagens.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Determinar a prevalência de anticorpos anti-*N.caninum* em canídeos selvagens cativos de diferentes estados brasileiros.
- ◆ Realizar diagnóstico parasitológico de fezes de diferentes espécies de canídeos selvagens cativos, verificando a presença de oocistos.
- ◆ Identificação dos oocistos encontrados pela técnica de PCR.
- ◆ Extração de DNA de fezes de canídeos selvagens e identificação das amostras extraídas pela técnica de PCR.

4 NEOSPOROSE EM BOVINOS

A neosporose está amplamente distribuída nos rebanhos bovinos mundiais. Estudos determinaram a soroprevalência de anticorpos anti-*N.caninum* em diversos países, como Brasil, Argentina, Austrália, Canadá, Alemanha, Irlanda, México, Polônia, Nova Zelândia, França, Rússia, Turquia, etc. Ainda que as técnicas diagnósticas utilizadas e os pontos de cortes sejam distintos nos diferentes estudos, impossibilitando assim uma comparação das prevalências no mundo, essas pesquisas comprovam a distribuição cosmopolita do *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 2007).

No Brasil, as soroprevalências da neosporose bovina variam de 6,8% a 89,7%, nos estados do Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, Bahia, Rondônia, Pernambuco e Goiás (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2001; RAGOZO *et al.*, 2003; GENNARI, 2004; GUIMARÃES JR *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2006). Uma pesquisa no Sul do Brasil verificou que 37 dentre 110 fetos abortados estavam infectados por *N. caninum* (CORBELLINI *et al.*, 2006).

Além de diagnósticos sorológicos, já foi realizado o isolamento do *N. caninum* de tecidos de bovinos em vários países, comprovando os animais desta espécie como hospedeiros intermediários do parasito (DUBEY *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). No Brasil, o isolamento foi feito em tecidos de cérebro de fetos abortados e de bezerro com cegueira congênita (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; 2004). O primeiro isolamento do parasito de tecidos de fetos abortados foi feito por Conrad e colaboradores (CONRAD *et al.*, 1993).

A transmissão transplacentária de *N. caninum* é considerada a principal via de infecção em bovinos e pode ocorrer em gestações e gerações sucessivas, mantendo a infecção no rebanho (ANDERSON *et al.*, 2000; HADDAD *et al.*, 2005; INNES, 2007). A transmissão ocorre quando taquizoítas existentes no organismo da mãe infectada atravessam a barreira placentária. Vários estudos têm verificado diferenças na forma de transmissão congênita se a infecção ocorreu durante a gestação ou quando houve uma reagudização de uma infecção pré-existente (TREE e WILLIAMS, 2005). Nos ruminantes, não há transferência de anticorpos da mãe para os filhotes, portanto, a detecção de anticorpos preclostrais em bezerros comprova a síntese intra-uterina dos anticorpos pelo feto e conseqüentemente a transmissão vertical do *N. caninum* (DUBEY *et al.*, 2007). Entretanto, resultados sorológicos negativos em bezerros com menos de 180 dias devem ser interpretados com cautela, pois o sistema imune destes animais ainda não é

completamente competente (BARTLEY *et al.*, 2004). Até o momento não foi comprovada transmissão natural via leite, colostro ou sêmen (SANDERSON, 2007), mas o DNA de *N. caninum* foi encontrado no colostro de vacas soropositivas (MOSKWA *et al.*, 2007).

A presença de cães soropositivos foi considerada fator de risco para infecção de rebanhos em pesquisas que demonstraram forte associação entre esses fatores (BASSO *et al.*, 2001; SCHARES *et al.*, 2004). Entretanto, um estudo realizado no estado do Paraná, Brasil, indicou que a presença de cães soropositivos para *N. caninum* nas propriedades rurais não contribui para a soroprevalência dos bovinos (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2009).

O aborto é a principal consequência da infecção causada pelo *N. caninum* nos rebanhos. As vacas soropositivas apresentam chances duas a sete vezes maiores de abortar que as soronegativas (SANDERSON, 2007). O aborto ocorre geralmente entre o quarto e o sexto mês de gestação, e os animais não apresentam nenhum sinal clínico que sugira o abortamento (ANDERSON *et al.*, 2000). Quando as gestações de vacas soropositivas vão a termo, podem nascer fetos com sinais neurológicos como paresia de membros, ataxia, incoordenação, opistótono, ausência de tônus muscular (DUBEY, 1999; SANTOS *et al.*, 2006), no entanto na maior parte dos casos nascem animais portadores assintomáticos (ANDERSON *et al.*, 2000).

5 NEOSPOROSE EM CÃES

Por tratar-se de uma doença de ampla distribuição, suspeitou-se da participação de um carnívoro cosmopolita no ciclo da neosporose. Em 1998, McAllister e colaboradores descobriram que os cães domésticos eram capazes de eliminar oocistos de *Neospora caninum* (McALLISTER *et al.*, 1998). O papel dos cães como hospedeiros definitivos também foi confirmado no ano seguinte (LINDSAY, DUBEY e DUNCAN, 1999). Eles podem atuar também como hospedeiros intermediários do parasito, desenvolvendo um quadro de doença neuromuscular muitas vezes fatal (DUBEY, 2003).

O primeiro relato de neosporose clínica em cães data de 1984 e foi feito em filhotes da raça Boxer que apresentavam sinais neurológicos e foram a óbito (BARBER e TREES, 1996).

Os principais sinais clínicos da doença são paralisia de membros pélvicos com hiperextensão rígida, paresia com ataxia, atrofia muscular, mialgia, paresia de membros torácicos, alterações comportamentais, cegueira central, coriorretinite, tremores,

convulsões, incontinência urinária e fecal, e mais raramente alterações em nervos cranianos, nistagmo e estrabismo. Pode acometer animais de todas as idades e raças, mas animais infectados de maneira congênita parecem desenvolver as formas mais graves da doença (DUBEY, 2007a).

O diagnóstico pode ser feito pela pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* por meio de técnicas sorológicas, como imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA, ou parasitológicas, nas quais se detecta a presença do parasito em lesões histopatológicas por imunohistoquímica ou pela reação em cadeia da polimerase. Por serem hospedeiros definitivos do *N. caninum*, os cães são capazes de eliminar oocistos do protozoário nas fezes, no entanto, o exame parasitológico de fezes não deve ser usado para diagnóstico da doença clínica, pois nunca foram encontrados em animais com a doença ativa (LINDSAY *et al.*, 1999).

Estudos descreveram a soroprevalência e a ocorrência da doença em cães em diversos países da Europa (LASRI *et al.*, 2004; PITEL *et al.*, 2001; DUBEY *et al.*, 2007), da Ásia (KIM *et al.*, 2003; KYAW *et al.*, 2004), das Américas (CHEADLE *et al.*, 1999; BASSO *et al.*, 2001; DUBEY *et al.*, 2007), incluindo o Brasil, onde tem-se resultados no Mato Grosso do Sul (ANDREOTTI *et al.*, 2006), em Minas Gerais (FERNANDES *et al.*, 2004), no Paraná (SOUZA *et al.*, 2002), entre outros (DUBEY *et al.*, 2007).

O primeiro isolamento de *N. caninum* proveniente de tecido de cão no Brasil foi feito em 2001 (GONDIM *et al.*, 2001).

Pesquisas demonstram uma maior frequência de infecção por *N. caninum* em cães de áreas rurais em relação aos residentes em meio urbano, o que pode ser explicado pelo maior contato de animais que moram próximos a fazendas com carcaças e restos de fetos contaminados (WANHA *et al.*, 2005; HORNOK *et al.*, 2006).

6 NEOSPORA CANINUM EM ANIMAIS SELVAGENS

O ciclo silvestre da neosporose tem sido estudado em diversos países, principalmente após a confirmação de uma espécie de canídeo selvagem norte-americana, os coiotes (*Canis latrans*), como hospedeiro definitivo (GONDIM, 2006). Esta comprovação foi feita pela observação dos oocistos nas fezes de animais desta espécie após a ingestão de tecidos contaminados com *Neospora caninum* (GONDIM *et al.*, 2004). Detectou-se também a presença de infecção pelo coccídeo em cervos (*Odocoileus virginianus*) norte-americanos, evidenciando assim a manutenção de um ciclo selvagem

da neosporose nos Estados Unidos (VIANNA *et al.*, 2005).

A importância da participação dos animais silvestres no ciclo da neosporose ainda merece mais estudos, no entanto uma pesquisa realizada nos Estado Unidos revelou um aumento no risco de infecção do gado de corte associado a áreas com altas concentrações de coiotes e outros canídeos selvagens (BARLING *et al.*, 2000).

Considerando-se a similaridade fisiológica e comportamental dos coiotes com outras espécies de canídeos selvagens, existe a possibilidade de que estas também atuem como hospedeiros definitivos deste parasito. Oocistos de *N. caninum* não foram observados nas fezes de raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) que ingeriram tecidos de animais contaminados (ROSYPAL e LINDSAY, 2005; SCHARES *et al.*, 2002). No entanto, foram encontrados oocistos morfológica e molecularmente semelhantes aos oocistos de *N. caninum* em fezes de dois animais, do total de 271 raposas-vermelhas. Todos os animais eram de vida livre e não foram experimentalmente infectados. Entretanto, devido ao fato de ter sido encontrado um pequeno número de oocistos e em apenas dois animais, o autor do trabalho julga necessários mais estudos antes de considerar a raposa-vermelha como a segunda espécie de canídeo selvagem descoberta como hospedeiro definitivo do *N. caninum* (WAPENAAR *et al.*, 2006).

Além dos canídeos, outras espécies de carnívoros não-domésticos já foram pesquisadas com o objetivo de encontrar outros hospedeiros definitivos para este protozoário. Três espécies de mustelídeos foram alimentadas com tecidos infectados com *N. caninum* para avaliar a capacidade dessas espécies em excretar oocistos do parasito. Nenhum animal eliminou oocistos em suas fezes, não sendo comprovada neste estudo, portanto, a hipótese dessas espécies atuarem como hospedeiros definitivos deste protozoário (McALLISTER *et al.* 1999).

6.1 NEOSPOROSE EM ANIMAIS SELVAGENS NO MUNDO

Pesquisas com *N. caninum* estão sendo realizadas em vários países e em diferentes espécies não-domésticas, carnívoras e herbívoras, muitas soropositivas para *Neospora caninum*. Estudos sorológicos detectaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* em seis espécies selvagens nos Estados Unidos, dez espécies na América do Sul, sete espécies na Europa, nove espécies na África e uma na Austrália. Essas espécies contemplam o grupo dos mustelídeos, canídeos, felídeos, bovídeos e cervídeos (SEDLÁK e BÁRTOVÁ, 2006), dentre outras. Na América do sul, evidências de exposição

ao *N. caninum* foi mencionada em bovinos, cabras, ovelhas, canídeos, gatos, gambás (*Didelphis marsupialis*), búfalos, alpacas, vicunhas e lhamas (MOORE, 2005; WOLF *et al.*, 2005).

6.1.1 Carnívoros

Em um estudo realizado na Espanha (SOBRINO *et al.* 2008), anticorpos anti-*N.caninum* foram detectados por pelo menos duas técnicas sorológicas diferentes, em duas espécies de felídeos (*Lynx pardinus* e *Felis silvestres*), quatro espécies de mustelídeos (*Martes foina*, *Martes martes*, *Meles meles* e *Mustela putorius furo*) e duas espécies de canídeos (*Vulpes vulpes* e *Canis lupus*). Este trabalho foi o primeiro a detectar a infecção por *N. caninum* em carnívoros selvagens de vida livre na Espanha e a relatar o contato desse parasito com espécies selvagens de vida livre, que não canídeos, na Europa.

Três espécies africanas de carnívoros apresentaram soropositividade para *N. caninum* (*Crocuta crocuta*, *Acinonyx jubatus* e *Panthera leo*), e algumas espécies herbívoras (*Taurotragus oryx*, *Syncerus caffer*, *Gazella thompsoni*, *Aepyceros melampus*, *Phacochoerus aethiopicus*), com destaque para o primeiro relato em zebras (*Equus burchelli*) (FERROGLIO *et al.*, 2003).

6.1.2 Não-carnívoros

Os cervídeos são um grupo de herbívoros frequentemente pesquisados quanto a sua participação no ciclo da neosporose, porque veados-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) foram identificados como hospedeiros intermediários naturais de *N. caninum* nos Estados Unidos, após isolamento do parasito em tecidos deste hospedeiro (VIANNA *et al.*, 2005). Outros autores já haviam detectado altos índices de soroprevalência de *N. caninum* em animais desta espécie (DUBEY *et al.*, 1999; LINDSAY *et al.*, 2002). Cervídeos das espécies *Odocoileus hemionus columbianus* e *Odocoileus hemionus hemionus* também foram examinados e apresentaram soropositividade para *N.caninum* (DUBEY *et al.*, 2008).

Na Espanha, foi realizado estudo de soroprevalência para *N.caninum* em várias espécies selvagens não-carnívoras, encontrando-se positividade em cervo-nobre (*Cervus elaphus*), aoudade (*Ammotragus lervia*), corça (*Capreolus capreolus*), javali (*Sus scrofa*) e lebre-ibérica (*Lepus granatensis*), todos animais de vida livre capturados nas estações de

caça (ALMERÍA *et al.*, 2007).

Há relatos de abortos em lhamas causados por *N. caninum* (CHAVEZ-VELASQUEZ *et al.*, 2004) e a soroprevalência para *N. caninum* encontrada nesse animais na Argentina foi de 4,6% (MOREÉ *et al.*, 2008) e no Peru foi de 1,2% (WOLF *et al.*, 2005).

Uma pesquisa realizada com espécies de ruminantes selvagens encontrou soropositividade para *N. caninum* em *Rupicapra rupicapra*, *Cervus elaphus* e *Capreolus capreolus*, todos animais de vida livre e do continente europeu (BREGOLI *et al.*, 2006).

No intuito de identificar reservatórios de *N. caninum*, foram realizados alguns estudos com roedores. Ferroglio *et al.* (2007) encontraram DNA do protozoário em tecidos de três espécies de roedores (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Apodemus sylvaticus*) capturados próximo a fazendas italianas com casos de aborto em vacas. Em outro trabalho, realizado nos Estados Unidos, roedores das espécies *M. musculus* e *R. norvegicus* também apresentaram DNA do parasito nos seus tecidos (JENKINS *et al.*, 2007). *R. norvegicus* de Taiwan apresentaram soropositividade para *N. caninum*, bem como DNA do parasito nos tecidos (HUANG *et al.*, 2004). Coelhos selvagens (*Oryctolagus cuniculus*) foram pesquisados na Inglaterra e identificou-se a presença do protozoário em 10,6% dos animais (HUGHES *et al.*, 2008). A importância dos roedores no ciclo da neosporose ainda não está completamente elucidada.

Por fazerem parte da dieta da maioria dos carnívoros, as aves também são investigadas sobre seu potencial como hospedeiros de *N. caninum*. Alguns pombos (*Columba livea*) e uma espécie de passeriforme (*Poephila guttata*) foram infectados experimentalmente com taquizoítos do protozoário, no entanto somente os pombos desenvolveram a infecção (McGUIRE *et al.*, 1999). Pombos foram confirmados como bons modelos experimentais para estudos com *N. caninum* por Mineo e colaboradores (2008), porque animais inoculados com taquizoítas do parasito soroconverteram e a disseminação do protozoário nos tecidos foi confirmada pela técnica de imunohistoquímica. Recentemente, frangos domésticos (*Gallus gallus*) foram identificados como hospedeiros intermediários naturais de *N. caninum* por técnicas sorológicas e moleculares (COSTA *et al.*, 2007).

6.1.3 Canídeos

Dentre os canídeos, pesquisas demonstraram soropositividade para *N. caninum* em coiotes (*Canis latrans*) (LINDSAY *et al.*, 1996; GONDIM *et al.*, 2004a; WAPENAAR *et*

al., 2007), lobos-cinzentos (*Canis lupus*) (GONDIM *et al.*, 2004a; DUBEY e THULLIEZ, 2005; STEINNMANN *et al.* 2006; SOBRINO *et al.*, 2008), raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) (WOLF *et al.*, 2001; ALMERIA *et al.*, 2002; HAMILTON *et al.*, 2005; WANHA *et al.*, 2005; STEINNMANN *et al.* 2006; JAKUBEK *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2007; WAPENAAR *et al.*, 2007) e raposas-cinzentas (*Urocyon cinereoargenteus*) (LINDSAY, WESTON e LITTLE, 2001).

Cérebros de raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) da República Checa, coletados de animais de vida livre recém-abatidos, foram submetidos a técnicas moleculares e foi observada presença do parasito em 4,61% deles (HURKOVÁ *et al.*, 2006).

6.2 NEOSPOROSE EM ANIMAIS SELVAGENS NO BRASIL

No Brasil, estudos com cervídeos foram realizados em diferentes estados. Em um trabalho realizado com animais de zoológicos e criadouros, foram encontrados anticorpos anti-*N.caninum* em 42% dos animais (TIEMANN *et al.*, 2005). Outro estudo, realizado com cervídeos de vida livre da espécie *Ozotocerus bezoarticus*, detectou uma maior soroprevalência em indivíduos de áreas com maior exposição aos animais domésticos, como cães (TIEMANN *et al.*, 2005a). Informações como estas confirmam que as pesquisas com *Neospora caninum* em animais selvagens são importantes para o conhecimento da epidemiologia do parasito e para a conservação das espécies.

Dentre os canídeos, foram feitas pesquisas em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (VITALIANO *et al.*, 2004), graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (CÂNON-FRANCO *et al.*, 2004). No entanto, a soropositividade só foi encontrada em animais cativos.

As prevalências encontradas para presença de anticorpos anti-*N.caninum* por CÂNON-FRANCO *et al.* (2004) foram 41,6% para graxaim-do-campo e 26,6% em cachorros-do-mato. O trabalho com lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) detectou anticorpos anti-*N. caninum* em 8,5% dos animais estudados, correspondendo apenas a animais cativos (VITALIANO *et al.*, 2004), provavelmente devido ao número reduzido de amostras provenientes de animais de vida livre.

Outro estudo realizado no Brasil analisou soros provenientes de 48 lobos-guará de zoológicos e de vida livre e de dois cachorros-do-mato, não encontrando positividade na reação de imunofluorescência indireta em nenhuma das amostras testadas (MELO *et al.*, 2002).

A via de infecção mais provável para os animais cativos é a ingestão de carnes cruas, já que o *N. caninum* está disseminado em criações de bovinos (DUBEY *et al.*, 2007) e outros animais de produção em todo o país. O fornecimento de carne sem cozimento é uma prática que ocorre em cativeiros de todo o Brasil.

Os dados disponíveis a respeito de estudos realizados em animais de vida livre no Brasil são insuficientes. Estima-se que esses animais, atuando como hospedeiros definitivos ou intermediários, participem de forma mais significativa na disseminação da doença. Desta forma, pesquisas com indivíduos não-cativos justificam-se por sua importância epidemiológica. Além disso, a comprovação da existência de um ciclo selvagem seria de extrema relevância para balizar medidas de controle da neosporose.

6.3 DIAGNÓSTICO

6.3.1 Diagnóstico Sorológico

O teste sorológico de imunofluorescência indireta (RIFI) é a prova de referência para pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum*, considerada como padrão ouro. E o principal exame utilizado para diagnóstico de *N. caninum* em animais silvestres. O resultado é positivo quando ocorre fluorescência em todo o taquizoíta; fluorescência reduzida ou apical ocorre nos soros com títulos baixos e nas reações cruzadas com espécies relacionadas, como *Toxoplasma gondii* (ANDREOTTI *et al.*, 2004). Silva *et al.* (2007) demonstraram que o teste de imunofluorescência indireta é mais apropriado para diagnóstico de *Neospora caninum* quando comparado com o ELISA. Estes mesmos pesquisadores sugerem que a diluição inicial na proporção de 1:50 é a mais adequada, levando em consideração os níveis de sensibilidade e especificidade do teste.

Como a RIFI exige conjugados espécie-específicos, isso dificulta sua utilização em pesquisas com animais selvagens. De um modo geral, os trabalhos são realizados utilizando-se conjugados desenvolvidos para espécies domésticas próximas filogeneticamente às espécies selvagens em questão. Esses trabalhos têm apresentado bons resultados e conjugados desenvolvidos para pesquisa com cães domésticos já foram inclusive validados para serem utilizados com amostras de espécies de canídeos selvagens brasileiros em um estudo realizado por Silva e colaboradores (2005). Alguns pesquisadores, todavia, utilizam o teste de aglutinação para *Neospora caninum* (NAT), que por buscar diretamente o antígeno não depende da espécie em que foi coletada a

amostra a ser testada. Esta técnica, porém, apresentou a especificidade mais baixa dentre as várias técnicas comparadas em um estudo com coiotes e raposas-vermelhas no Canadá (WAPENAAR *et al.*, 2007).

Todas essas técnicas sorológicas possuem pontos de corte, sensibilidade e especificidade diferentes, portanto os resultados dos diferentes estudos realizados com espécies selvagens são de difícil comparação e análise.

6.3.2 Diagnóstico Coproparasitológico

A técnica de escolha para verificação de oocistos nas fezes é a centrifugo-flutuação com solução de açúcar (MCALLISTER *et al.*, 1998).

Os cães são hospedeiros de vários parasitos pertencentes ao grupo dos coccídios. Os oocistos destes parasitos são morfologicamente semelhantes e muitas vezes indistinguíveis à observação microscópica. Nestes casos, técnicas de biologia molecular são indispensáveis para auxiliar o diagnóstico coproparasitológico em hospedeiros definitivos.

Outra dificuldade encontrada é a quantidade de oocistos eliminada e a frequência de eliminação, que não são constantes e dependem de diversos fatores como fonte e carga de infecção, estado imunológico e período do ciclo (DUBEY *et al.*, 2007).

6.3.3 Diagnóstico Molecular

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo utilizada para distinguir entre oocistos de *Neospora caninum* e de *Hammondia heydorni*, conforme descrito por Slapeta *et al.*, em 2002. *Hammondia heydorni* é um coccídio não patogênico que apresenta estreita relação filogenética com *N. caninum* (MUGRIDGE *et al.*, 1999).

Além de auxiliar na identificação dos oocistos, técnicas moleculares também são utilizadas para verificação da presença do parasito em amostras de tecidos. Foi detectada a presença de DNA de *N. caninum* em cérebros de raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) (ALMERIA *et al.*, 2002), de lhamas (*Lama glama*) e alpacas (*Vicugna pacos*) (SERRANO-MARTÍNEZ *et al.*, 2004), e de ratos (*Rattus norvegicus*) (HUANG *et al.*, 2004).

6.3.4 Diagnóstico Histopatológico

Ainda que não se tenham estudos acerca dos sinais clínicos da neosporose em canídeos selvagens, as lesões histopatológicas encontradas em animais selvagens infectados com *N. caninum* são semelhantes às encontradas em domésticos. Foi verificada encefalite multifocal não supurativa em antílopes (*Tragelaphus imberbis*) natimortos, soropositivos para *N. caninum* (PETERS *et al.*, 2001). Um filhote de cervo-dama (*Dama dama*) morreu três semanas após o nascimento apresentando meningoencefalite multifocal necrotizante e granulomatosa. O diagnóstico de infecção por *N. caninum* confirmou-se pela identificação dos cistos teciduais do protozoário por imunohistoquímica (SOLDATI *et al.*, 2004).

6.3.5 Diagnóstico Imunohistoquímico

Técnicas de imunohistoquímica (IHC) são importantes principalmente para identificar cistos de *N. caninum* em tecidos dos animais infectados, após a detecção de lesões compatíveis com a presença deste parasito. Esta técnica vem sendo utilizada também em animais selvagens e muitas vezes é realizada em conjunto com técnicas moleculares.

Cistos de *N. caninum* foram identificados por IHC em cortes de cerebelo de uma fêmea jovem de racon (*Procyon lotor*), que morreu apresentando convulsões (LEMBERGER *et al.*, 2005). Taquizoítos e cistos contendo bradizoítos foram identificados por IHC como *N. caninum* no pericárdio de um filhote de rinoceronte (WILLIAMS *et al.*, 2002).

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A participação dos animais selvagens no ciclo da neosporose necessita de maiores estudos. As espécies que entraram em contato com o *N. caninum* citadas nessa revisão certamente não representam a totalidade de espécies selvagens infectadas pelo parasito. A participação das espécies selvagens na dispersão do protozoário pelos rebanhos bovinos também merece maior atenção. As tentativas de identificação de novos hospedeiros definitivos e os estudos sobre a doença clínica em animais selvagens devem avançar, porque está confirmada a presença do parasito mas não são realizados os

diagnósticos diferenciais em quadros de doenças neurológicas em animais selvagens.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S.; VIDAL, D.; FERRER, D.; PABLÓN, M.; FERNÁNDEZ-de-MERA, M.I.G.; RUIZ-FONS, F.; ALZAGA, V.; MARCO, I.; CALVETE, C.; LAVIN, S.; GORTAZAR, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; DUBEY, J.P. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. *Veterinary Parasitology*, v 143, p. 21-28, 2007.

ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABLÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v.107, p. 287-294, 2002.

ANDREOTTI, R.; OLIVEIRA, J.M.; ARAUJO e SILVA, E.; OSHIRO, L.M.; MATOS, M.F.C. Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 135, p. 375-379, 2006.

ANDREOTTI, R. Teste Sorológico de Imunofluorescência Indireta para o Diagnóstico da Neosporose em Bovinos. Comunicado Técnico 86 – EMBRAPA Gado de Corte, 1 ed. Campo Grande, 2004.

ANDERSON, M.L.; ANDRIANARIVO, A.G.; CONRAD, P.A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*. v. 60-61, p. 417-431, 2000.

BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Veterinary Record*, v. 139, p. 439 – 443, 1996.

BARLING, K.S.; SHERMAN, M.; PETERSON, M.J.; THOMPSON, J.A.; McNEILL, J.W.; CRAIG, T.M.; ADAMS, L.G. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 217, p.1361-1365, 2000.

BARR, B.C.; CONRAD, P.A.; SVERLOW, K.W.; TARANTAL, A.F.; HENDICKX, A.G. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Laboratory Investigation*, v. 71, p. 236-242, 1994.

BARTLEY, P.M.; KIRVAR, E.; WRIGHT, S.; SWALES, C.; ESTEBAN-REDONDO, I.; BUXTON, D.; MALEY, S.W.; SCHOCK, A.; RAE, A.G.; HAMILTON, C.; INNES, E.A. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *Journal of Comparative Pathology*, v.130, p. 81-91, 2004.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; MOORE, D.P.; RAMBEAU, M.; UNZAGA, J.M.; CAMPERO, C.; BACIGALUPE, D.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *The Journal of Parasitology*, v. 87, p. 906-907, 2001.

BREGOLI, M.; GIOIA, C.; STEFANO, N.; MARIPIA, C.; CLAUDIO, P. Serological survey of *Neospora caninum* in free-ranging wild ruminants. *Veterinarski arhiv*, v. 76, p. 111-115, 2006.

CÂNON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 123, p. 275 – 277, 2004.

CHAVEZ-VELASQUEZ, A.; ALVAREZ-GARCIA, G.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; CASAS-ASTOS, E.; ROSADIO-ALCANTARA, R.; SERRANO-MARTINEZ, E.; ORTEGA-MORA, L.M. First report of *Neospora caninum* infection in adult alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). *Journal of Parasitology*, v. 90, p. 864 – 866, 2004.

CHEADLE, M.A.; LINDSAY, D.S.; ROWE, S.; DYKSTRA, C.C.; WILLIAMS, M.A.; SPENCER, J.A.; TOIVIO-KINNUCAN, M.A.; LENZ, S.D.; NEWTON, J.C.; ROLSMAN, M.D.; BLAGBURN, B.L. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1537-1543, 1999.

CONRAD, P.A.; BARR, B.C.; SVERLOW, K.W.; ANDERSON, M.; DAFT, B.; KINDE, H.; DUBEY, J.P.; MUNSON, L.; ARDANS, A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology*, v. 106, p. 239-249, 1993.

CORBELLINI, L.G.; PESCADOR, C.A.; FRANTZ, F.; WUNDER, E.; STEFFEN, D.; SMITH, D.R.; DRIEMEIER, D. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to

Neospora caninum infection: Importance, repeated abortion and concurrence infection in aborted fetuses in Southern Brazil. The Veterinary Journal, v. 172, p. 114-120, 2006.

COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; UZÊDA, R.S.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.; ARAÚJO, F.R.; McALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v. 38, p. 157-159, 2008.

DUBEY, J.P.; MANSFIELD, K.; HALL, B.; KWOK, O.C.H.; THULLIEZ, P. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) and mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). Veterinary Parasitology, v. 156, p. 310-313, 2008.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. Clinical Microbiology Reviews, v. 20, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; VIANNA, M.C.B.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; TUO, W.; VELMURUGAN, G.V.; CONORS, M.; JENKINS, M.C. Neosporosis in beagle dogs: Clinical signs, diagnosis, treatment, isolation and genetic characterization of *Neospora caninum*. Veterinary Parasitology, v. 149, p. 158-166, 2007a.

DUBEY, J.P.; THULLIEZ, P. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. Journal of Parasitology, v. 91, p. 1217-1218, 2005.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean Journal of Parasitology, v. 41, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia.

International Journal for Parasitology, v. 32, p. 929 - 946, 2002.

DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Veterinary Parasitology, v. 84, p. 349 -367, 1999.

DUBEY, J.P.; HOLLIS, K.; ROMAND, S.; THULLIEZ, P.; KWOK, O.C.H.; HUNGERFORD, L.; ANCHOR, C.; ETHER, D. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). International Journal for Parasitology, v. 29, p. 1709-1711, 1999.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 192, 1269-1285, 1988.

FERNANDES, B.C.T. M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Veterinary Parasitology, v. 123, p. 33-40, 2004.

FERROGLIO, E.; PASINO, M.; ROMANO, A.; GRANDE, D.; PREGEL, P.; TRISCIUOGGIO, A. Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. Veterinary Parasitology, v. 148, p. 346-349, 2007.

FERROGLIO, E.; WAMBWA, E.; CASTIELLO, M.; TRISCIUOGGIO, A.; PROUTEAU, A.; PRADERE, E.; NDUNGU, S.; De MENEGHI, D. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya, East Africa. Veterinary Parasitology, v. 118, p. 43-49, 2003.

GENNARI, S. M. *Neospora caninum* no Brasil: situação atual da pesquisa. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 13, suplemento 1, p. 23 -28, 2004.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. Trends in Parasitology, v. 22, p. 247-252, 2006.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis*

latrans) are definitive hosts of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v. 34, 159 – 161, 2004.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; MATEUS-PINILLA, N.E.; PITT, W.C.; MECH, L.D.; NELSON, M.E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. Journal of Parasitology, v. 90, p. 1361-1365, 2004a.

GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. Journal of Parasitology, v. 88, p.1159 – 1163, 2002.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; McALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. Veterinary Parasitology, v. 101, p. 1-7, 2001.

GUIMARÃES Jr, J.S.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. Veterinary Parasitology, v. 124, p. 1-8, 2004.

HADDAD, J. P. A.; DOHOO, I. R.; VANLEEWEN, J. A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle - a Canadian perspective. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne, v.46, p. 230-243, 2005.

HAMILTON, C.M.; GRAY, R.; WRIGHT, S.E.; GANGADHARAN, B.; LAURENSEN, K.; INNES, E.A. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from around the UK. Veterinary Parasitology, v. 130, p. 169-173, 2005.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). Veterinary Research, v. 35, p. 283-290, 2004.

HUGHES, J.M.; THOMASSON, D.; CRAIG, P.S.; GEORGIN, S.; PICKLES, A.; HIDE, G. *Neospora caninum*: Detection in wild rabbits and investigation of co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis. *Experimental Parasitology*, v. 120, p. 255-260, 2008.

HURKOVÁ, L.; MODRY, D. PCR Detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 150-154, 2006.

INNES, E.A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology*, v. 134, p. 1903-1910, 2007.

JAKUBEK, E-B; FARKAS, R.; PALFI, P.; MATTSSON, J.G. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Hungarian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, v.144, p. 39 – 44, 2007.

JENKINS, M.C.; PARKER, C.; HILL, D.; PINCKNEY, R.D.; DYER, R.; DUBEY, J.P. *Neospora caninum* detected in feral rodents. *Veterinary Parasitology*, v. 143, p. 161-165, 2007.

KIM, J.H.; KANG, M.S.; LEE, B.C.; HWANG, W.S.; LEE, C.W.; SO, B.J.; DUBEY, J.P.; KIM, D.Y. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs and raccoon dogs in Korea. *Korean Journal of Parasitology*, v. 41, p. 243-245, 2003.

KYAW, T.; VIRAKUL, P.; MUANGYAI, M.; SUWIMONTEERABUTR, J. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle in central Thailand. *Veterinary Parasitology*, v. 121, p. 255-263, 2004.

LASRI, S.; De MEERSCHMAN, F.; RETTIGNER, C.; FOCANT, C.; LOSSON, B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Veterinary Parasitology*, v. 123, p. 25-32, 2004.

LEMBERGER, K.Y.; GONDIM, L.F.P.; PESSIER, A.P.; McALLISTER, M.M.; KINSEL, M.J. *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent

canine distemper virus infection. *The Journal of Parasitology*, v. 91, p. 960-961, 2005.

LINDSAY, D.S.; LITTLE, S.E.; DAVIDSON, W.R. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from the southeastern United States. *Journal of Parasitology*, v. 88, p. 415-417, 2002.

LINDSAY, D.S.; WESTON, J.L.; LITTLE, S.E. Short communication: Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). *Veterinary Parasitology*, v. 97, p.159–164, 2001.

LINDSAY, D.S.; RITTER, D.M.; BRAKE, D. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 909–911, 2001a.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal for Parasitology*, v. 29, p. 1521-1523, 1999.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v. 82, p. 327-333, 1999.

LINDSAY, D.S.; KELLY, E.J.; McKOWN, R.D.; STEIN, F.J.; PLOZER, J.; HERMAN, J.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology*, v. 82, p. 657 – 659, 1996.

LOBATO, J.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; AMARAL, J.D.H.F.; SILVA SEGUNDO, G.R.; COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S.; MINEO, J.R. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, p. 84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; MACHADO, P.C.; FRIDLUND-PLUGGD, N.; RICHARTZ, R.R.T.B.; MONTIANI-FERREIRA, F.; LENATI-PATRICIO, L.F.; PATRICIO, M.A.C.; GASINO-JOINEAU, M.E; PIEPPE, M. Determinação e correlação de anticorpos anti-

Neospora caninum em bovinos e cães do Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 2009, no prelo.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; DER VINNE, R.V.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. v.13, n.3, p. 103-109, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; PINCKNEY, R.D.; SOUSA, R.S.; LEITE, L.C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. Veterinary Record, v.153, p.366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; SOCCOL, V.T.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R. Serological diagnosis of Neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. Journal of Parasitology, v.87, p. 1493 – 1494, 2001.

McALLISTER, M.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M.; JOLLEY, W.R.; TRANAS, J.D.; WILLIAMS, E.S.; LINDSAY, D.S.; BJÖRKMAN, C.; BELDEN, E.L. Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. International Journal for Parasitology, v. 29, p. 1531-1536, 1999.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v. 28, p.1473 – 1478, 1998.

MCGUIRE, A.M.; McALLISTER, M.; WILLS, R.A.; TRANAS, J.D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. International Journal for Parasitology, v. 29, p. 1525-1529, 1999.

MELO, D.P.G.; SILVA, A.C.; ORTEGA-MORA, L.M.; BASTOS, S.A.; BOAVENTURA, C.M. Prevalência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 15, p. 105 – 109, 2006.

MELO, C.B.; LEITE, R.C.; LEITE, F.S.C.; LEITE, R.C. Serological surveillance on South American wild canids for *Neospora caninum*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, vol.54, n.4, 2002.

MINEO, T.W.; CARRASCO, A.O.; MARCIANO, J.A.; WERTHER, K.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. Veterinary Parasitology, 2008, no prelo.

MOORE, D.P. Neosporosis in South America. Veterinary Parasitology, v. 127, p. 87 – 97, 2005.

MORÉ, G.; PARDINI, L.; BASSO, W.; MARÍN, R.; BACIGALUPE, D.; AUAD, G.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C. Seroprevalence of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis* sp. in lhamas (*Lama glama*) from Jujuy, Argentina. Veterinary Parasitology, v. 155, p. 158- 160, 2008.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K.; BIEN, J.; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. Parasitology Research, v.100, p. 633– 636, 2007.

MUGRIDGE, N.B.; MORRISON, D.A.; HECKEROTH, A.R.; JOHNSON, A.M.; TENDER, A.M. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology, v. 29, p. 1545-1556, 1999.

MURPHY, T.M.; WALOCHNIK, J.; HASSL.A.; MOONEY, J.; TOOLAN, D.; SANCHEZ-MIGUEL, C.; O'LOUGHLIN, A.; McAULIFFE, A. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* and molecular evidence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. Veterinary Parasitology, v. 146, p. 227-234, 2007.

PETERS, M.; WOHLSEIN, P.; KNIERIEM, A.; SCHARES, G. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). Veterinary

Parasitology, v. 97, p. 153-157, 2001.

PITEL, P.H.; PRONOST, S.; CHATAGNON, G.; TAINURIER, D.; FORTIER, G.; BALLE, J.J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *Neospora caninum* in cattle and dogs. Veterinary Parasitology, v. 102, p. 269-277, 2001.

RAGOZO, A.M.A.; PAULA, V.S.O.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis Estados brasileiros. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.12, p.33-37, 2003.

ROSYPAL, A.C.; LINDSAY, D.S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? Trends in Parasitology, v. 21, p. 439-440, 2005.

SANDERSON, M.W. A review of *Neospora caninum* in cattle. Veterinary Newsletter, Dairy, Julho, p. 1-5, 2007.

SANTOS, A.P.M.E.; VIDOTTO, I.T.N.O.; BRACARENSE, R.L. Encefalomielite congênita em bezerros associada ao *Neospora caninum* no estado do Paraná, Brasil. Ciências Agrárias, v. 27, p. 111 – 114, 2006.

SCHARES, G.; BARWALD, A.; STAUBACH, C.; ZILLER, M.; KLOSS, D.; SCHRODER, R.; LABOHM, R.; DRAGER, K.; FASEN, W.; HESS, R.G.; CONRATHS, F.J. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. Parasitology, v. 129, p. 301–309, 2004.

SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CÜPPERS, A.; MEHLHORN, H.; GEUE, L.; PETERS, M.; CONRATHS, F.J. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. Parasitology research, v. 88, p. 44-52, 2002.

SCHARES, G.; PETERS, M.; WURM, R.; BARWALD, A.; CONRATHS, F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. *Veterinary Parasitology*, v. 80, p. 87-98, 1998.

SEDLÁK, K.; BÁRTOVÁ, E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*, v.136, p. 223- 231, 2006.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A.; CASAS-ASTOS, E.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; CHÁVEZ-VELÁSQUEZ, A.; ORTEGA-MORA, L.M. *Neospora* species-associated abortion in alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Llama glama*). *Veterinary Research*, v. 155, p. 748-749, 2004.

SILVA, D.A.O.; LOBATO, J.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, v. 143, p. 234-244, 2007.

SILVA, D.A.; VITALIANO, S.N.; MINEO, T.W.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *Journal of Parasitology*, v.95, n.5, p. 1212 – 1216, 2005.

SLAPETA, J.R.; KOUDELA, B.; VOTÝPKA, J.; MODRÝ, D.; HOREJS, R.; LUKES, J. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: Differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *The Veterinary Journal*, v. 163, p. 147-154, 2002.

SLAPETA, J.R.; MODRY, D.; KYSELOVA, R.; HOREJS, I.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Veterinary Parasitology*, v. 109, p. 157–167, 2002a.

SOBRINO, R.; DUBEY, J.P.; PABLÓN, M.; LINAREZ, N.; KWOK, O.C.; MILLÁN, J.; ARNAL, M.C.; LUCO, D.F.; LÓPEZ-GATIUS, F.; THULLIEZ, P.; GORTÁZAR, C.; ALMERÍA, S. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary*

Parasitology, v. 155, p. 190-197, 2008.

SOLDATI, S.; KIUPEL, M.; WISE, A.; MAES, R.; BOTTERON, C.; ROBERT, N. Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). Journal of Veterinary Medicine: Anatomy, Physiology, Pathology and Clinical Medicine, v. 51, p. 280-283, 2004.

SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, J.S.; FERREIRA, F.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. Journal of Parasitology, v. 88, p. 408-409, 2002.

STEINMAN, A.; SHPIGEL, N.Y.; MAZAR, S.; KING, R.; BANETH, G.; SAVITSKY, I.; SHKAP. Low prevalence of antibodies to *Neopora caninum* in wild canids in Israel. Veterinary Parasitology, v. 137, p. 155-158, 2006.

TIEMANN, J.C.H.; RODRIGUES, A.A.; de SOUZA, S.L.; DUARTE, J.M.; GENNARI, S.M. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in Brazilian cervids kept in captivity. Veterinary Parasitology, v. 129, p. 341-343, 2005.

TIEMANN, J.C.H.; SOUZA, S.L.P.; RODRIGUES, A.A.R.; DUARTE, J.M.B.; GENNARI, S.M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neopora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Veterinary Parasitology, v. 134, p. 73-76, 2005a.

TREE, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends in Parasitology, v. 21, p. 558-561, 2005.

VIANNA, M.C.B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Veterinary Parasitology, v. 129, p. 253 – 257, 2005.

VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of

Brazil. Veterinary Parasitology, v. 122, p. 253 – 260, 2004.

WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GLABER-EDUARDO, C.; PROSL, H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. Veterinary Parasitology, v. 128, p. 189 – 193, 2005.; HORNOK et al., 2006

WAPENAAR, W.; BARKEMA, H.W.; SCHARES, G.; ROUVINEN-WATT, K.; ZEIJLEMAKER, L.; POORTER, B.; O'HANDLEY, R.M.; KWOK, O.C.H.; DUBEY, J.P. Evaluation of four serological techniques to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) on Prince Edward Island, Canada. Veterinary Parasitology, v. 145, p. 51-58, 2007.

WAPENAAR, W.; JENKINS, M.C.; O'HANDLEY, R.M.; BARKEMA, H.W. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). Journal of Parasitology, v. 92, p. 1270-1274, 2006.

WILLIAMS, J.H.; ESPIE, I.; VAN WILPE, E.; MATTHEE, A. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simium*) calf. Journal of the South African Veterinary Association, v. 73, p. 38-43, 2002.

WOLF, D.; SCHARES, G.; CARDENAS, O.; HUANCA, W.; CORDERO, A.; BÄRWALD, A.; CONRATHS, F.J.; GAULY, M.; ZAHNER, H.; BAUER, C. Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicuñas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. Veterinary Parasitology, v. 130, p. 81-87, 2005.

WOLFE, A.; HOGAN, S.; MAGUIRE, D.; FITZPATRICK, C.; MULCAHY, G.; VAUGHAN, L.; WALL, D.; HAYDEN, T. J. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. Veterinary Record, v.149, p. 759 – 763, 2001.

ZHANG, W.; DENG, C.; LIU, Q.; LIU, J.; WANG, M.; TIAN, K.G.; YU, X.L.; HU, D.M. First identification of *Neospora caninum* infection in aborted bovine fetuses in China. Veterinary Parasitology, v.149, p. 72 – 76, 2007.

CAPÍTULO I

SOROPREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI - *Neospora caninum* E ANTI - *Toxoplasma gondii* EM CANÍDEOS SELVAGENS CATIVOS

Seroprevalence of antibodies anti-Neospora caninum and anti-Toxoplasma gondii in captive wild canids

ABSTRACT

Neosporosis is considered one of the main causes of abortion in dairy cattle in the world. The prevalence of *Neospora caninum* in wild species has been studied since the coyote (*Canis latrans*), a North American wild canid species was discovered as definitive host of this parasite. The aim of the present study was to determine the seroprevalence of *N. caninum* and *T. gondii* in wild native canids species from Brazil. Serum samples of 25 crab-eating dogs (*Cerdocyon thous*), five pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*), six bush dogs (*Speothos venaticus*) e 14 maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) were tested. The animals were from zoos and sanctuaries from the states of Parana, Santa Catarina, Rio de Janeiro and the Federal District. The total prevalence obtained for *N. caninum* was 36% (18/50) and for *T. gondii* was 40% (20/50). The present study demonstrated for the first time the presence of antibodies to *N. caninum* in bush dogs and the prevalence found was 33.3% (2/6). This study showed the presence of these protozoans in captive wild canids species and to alert about possible contamination sources.

KEY-WORDS: neosporosis, toxoplasmosis, canids, bush dogs

RESUMO

A neosporose é considerada uma das principais causas de aborto em bovinos leiteiros no mundo. A prevalência de *Neospora caninum* em espécies selvagens vem sendo estudada em diversos países, assim como o ciclo selvagem desta doença, desde a descoberta do coioate (*Canis latrans*), espécie de canídeo selvagem norte-americana, como hospedeiro definitivo deste parasito. No presente estudo, com o objetivo de determinar a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em espécies de canídeos nativas do Brasil, foram testadas amostras de soro de 25 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), cinco graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*), seis cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) e 14 lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Os animais eram residentes de zoológicos ou criadouros dos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro e do Distrito Federal. A soroprevalência total obtida para *N. caninum* foi de 36% (18/50) e para *T. gondii* foi de 40% (20/50). Trata-se do primeiro relato de soropositividade para *N. caninum* em animais da espécie *Speothos venaticus*, na qual a prevalência encontrada foi de 33,3% (2/6). Este estudo demonstrou a presença destes protozoários em espécies de canídeos selvagens cativas, alertando sobre as possíveis fontes de contaminação em cativeiro.

PALAVRAS-CHAVE: neosporose, toxoplasmose, canídeos, cachorro-vinagre

1 INTRODUÇÃO

A neosporose, doença causada pelo parasito *Neospora caninum*, é considerada um dos principais problemas mundiais na criação de bovinos, sendo responsável por altas taxas de aborto nos plantéis. Esta enfermidade acomete também os cães, causando doença neuromuscular muitas vezes fatal (DUBEY, BUXTON e WOUDA, 2006).

O *Neospora caninum* é um protozoário pertencente ao *phylum* Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 2002). É parasita intracelular obrigatório e possui um ciclo heteroxeno, sendo transmitido também por via vertical. A transmissão horizontal é de notável importância, pois se estima que um único hospedeiro definitivo seja capaz de eliminar aproximadamente 500.000 oocistos após a ingestão de uma única carcaça contaminada, o que seria suficiente para infectar milhares de animais em um rebanho (GONDIM *et al.*, 2002).

Por sua similaridade com outro coccídio da mesma família, o *Toxoplasma gondii*, o *Neospora caninum* só teve seu ciclo de vida elucidado em 1998 (McALLISTER *et al.*, 1998). Possui dois hospedeiros definitivos descritos até o momento, o cão doméstico e o coiote (*Canis latrans*). O ciclo silvestre da doença tem sido estudado em diversos países, principalmente após a descoberta desta espécie de canídeo selvagem norte-americana como hospedeiro definitivo. Esta comprovação foi feita pela verificação da presença de oocistos nas fezes de animais desta espécie após a ingestão de tecidos contaminados com *Neospora caninum* (GONDIM *et al.*, 2004). Detectou-se também a presença de infecção pelo coccídeo em cervos (*Odocoileus virginianus*) norte-americanos, evidenciando assim a manutenção de um ciclo selvagem da neosporose nos Estados Unidos (VIANA *et al.*, 2005).

Estudos sorológicos foram realizados pelo mundo em diferentes espécies não-domésticas, tanto carnívoras quanto herbívoras, muitas das quais apresentaram positividade para *Neospora caninum*. Na América do sul, evidências de exposição ao *N. caninum* foi mencionada em bovinos, cabras, ovelhas, canídeos, gatos, gambás (*Didelphis marsupialis*), búfalos, alpacas e lhamas (MOORE, 2005).

Dentre os canídeos, pesquisas demonstraram soropositividade para *N. caninum* em coiote (*Canis latrans*) (LINDSAY *et al.*, 1996), raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*) (ALMERIA *et al.*, 2002) e raposa-cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*) (LINDSAY, WESTON e LITTLE, 2001). No Brasil, poucos estudos sorológicos foram realizados em canídeos selvagens. Dentre as espécies brasileiras testadas, encontrou-se resultados

positivos para lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (VITALIANO *et al.*, 2004), graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (CÂNON-FRANCO *et al.*, 2004). A prevalência de *N. caninum* em canídeos selvagens cativos no estado do Paraná ainda não está descrita.

Infecção por *Toxoplasma gondii* também já foi descrita em espécies selvagens (LINDSAY *et al.*, 1996; WOLFE *et al.*, 2001), e geralmente possui prevalência maior entre essas espécies que *N. caninum* (LINDSAY, WESTON e LITTLE, 2001; VITALIANO *et al.*, 2004).

O objetivo do presente estudo foi determinar a soroprevalência de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em canídeos selvagens cativos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas amostras de sangue de 50 canídeos selvagens de espécies nativas do Brasil, clinicamente sadios, sendo 25 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), cinco graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*), seis cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) e 14 lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Os animais eram pertencentes ao Zoológico de Curitiba-PR (n=6), Zoológico de Pomerode-SC (n=7), Zoológico de Brasília-DF (n=15), Fundação RioZoo-RJ (n=1), Centro de Triagem IBAMA-PR/Pontifícia Universidade Católica do Paraná (n=5) e a um Criatório Conservacionista (n=16) localizado no município de Campina Grande do Sul, região metropolitana de Curitiba-PR. Do total de animais utilizados no estudo, 15 eram nascidos em cativeiro e 14 foram encaminhados aos Zoológicos e/ou criadouros provenientes de vida livre. Informações sobre a origem dos demais não estavam disponíveis. Quanto ao sexo, 21 amostras eram provenientes de fêmeas e 23 de machos.

As amostras de sangue foram colhidas das veias cefálica, jugular ou safena, em frascos sem anticoagulante. Os soros obtidos após centrifugação foram congelados a -20°C até a realização dos exames.

O diagnóstico sorológico foi feito pela Reação de Imunofluorescência Indireta, utilizando-se conjugado anti-cão IGg (Sigma®). Para confecção das lâminas de imunofluorescência, foram utilizadas as cepas Nc1 e RH para obtenção de antígenos de *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente. Os soros foram diluídos em solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) inicialmente na proporção de 1:50 e tituladas seqüencialmente até obtenção de resultado negativo. Foram consideradas positivas apenas as amostras

que apresentaram fluorescência periférica completa do taquizoíto. Soros de cães positivos e negativos para ambos os protozoários pesquisados foram utilizados como controles em cada lâmina.

Para análise estatística dos dados obtidos, foram comparadas as proporções entre o número de amostras positivas e o total de amostras dos diferentes grupos pelo *Fisher-Exact-Test*. Resultados que apresentaram $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Esta pesquisa foi submetida à avaliação do Comitê de Ética do Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná e do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, obtendo as licenças necessárias para sua realização.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de amostras testadas, 18 (36%) apresentaram resultado positivo para *Neospora caninum* e 20 (40%) para *Toxoplasma gondii*. Não houve diferença significativa entre o número de animais soropositivos para *N. caninum* e para *T. gondii* ($p \leq 0,05$). Houve 15 animais (30%) que apresentaram resultado negativo para ambos os parasitos testados e sete animais com sorologia positiva para *N. caninum* e *T. gondii* simultaneamente (14%). Os parasitos testados possuem vários antígenos semelhantes, no entanto a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tem se mostrado eficaz no diagnóstico sorológico e não tem sido observada reação cruzada em diluições a partir de 1:50 (SILVA *et al.*, 2007). Acredita-se, portanto, que os animais com resultados positivos para *N. caninum* e *T. gondii* apresentavam infecção por ambos os protozoários. A RIFI é considerada o teste padrão-ouro para o diagnóstico de neosporose canina. Um estudo comparou a RIFI com o teste de ELISA-indireto em soros de cães e encontrou reação cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii* somente quando utilizado o teste de ELISA-indireto, demonstrando que a RIFI apresenta maior especificidade no diagnóstico destes parasitos em cães (HIGA *et al.*, 2000). A eficiência da utilização de conjugados de imunofluorescência heterólogos para RIFI de *N. caninum* em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) foi atestada por Silva *et al.* (2005), validando, portanto, a utilização de conjugados anti-cão nesta espécie selvagem.

Numa pesquisa realizada com raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) na Hungria, foi encontrada soroprevalência de 68% para *T. gondii* pelo teste de aglutinação direta e 1,5% para *N. caninum* pela prova de ELISA-indireto (JAKUBEK *et al.*, 2007). Animais desta

mesma espécie foram testados na Áustria, e por meio da RIFI a prevalência encontrada para *T. gondii* foi de 35%, enquanto nenhuma das amostras testadas apresentou resultado positivo para *N. caninum* (WANHA *et al.*, 2005).

Os títulos finais e a distribuição dos resultados entre as espécies de canídeos estão apresentados nas TABELAS 1 e 2. Com exceção dos cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*), que só apresentaram anticorpos anti-*N. caninum*, as demais espécies apresentaram positividade para ambos os parasitos testados, simultaneamente ou não. Este é o primeiro relato de soropositividade para *N. caninum* em animais da espécie *Speothos venaticus* e a prevalência encontrada foi 33,3% (2/6). Animais desta espécie, residentes em um Zoológico da República Checa, já foram testados por SEDLÁK e BÁRTOVÁ (2006), porém os resultados foram negativos. Esta é a menor espécie de canídeo silvestre, medindo de 60 a 75 cm e pesando aproximadamente cinco a sete quilos. É encontrada em vários habitats, desde florestas úmidas até savanas arbóreas. Trata-se de uma espécie estritamente carnívora, ao contrário dos outros canídeos da América do Sul, e sua dieta parece constituir-se de grandes roedores, principalmente cutias (*Dasyprocta* sp.), pacas (*Agouti paca*) e capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), além de pequenos cervídeos do gênero *Mazama*. A obtenção de presas maiores do que seu tamanho é possível pelo padrão de caça cooperativa. A distribuição original desta espécie abrangia todo o Brasil, no entanto, este canídeo parece ser raro e a maior parte das informações sobre o cachorro-vinagre consiste de relatos não documentados. É considerada uma espécie em perigo no estado do Paraná e vulnerável no Brasil (MIKICH e BÉRNILS, 2004).

TABELA 1: Soroprevalência de anticorpos anti-*N.caninum*, detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta, em soros de canídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil.

ESPÉCIES	animais	Anti- <i>N.caninum</i> (títulos finais)									
		1/50	%	1/100	%	1/200	%	1/400	%	1/3200	%
<i>C. thous</i> (n=25)	25	9	36,0	0	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>L. gymnocercus</i> (n=5)	5	1	20,0	0	0	0	0,0	1	20,0	1	20,0
<i>S. venaticus</i> (n=6)	6	0	0,0	0	0	1	16,7	1	16,7	0	0,0
<i>C. brachyurus</i> (n=14)	14	4	28,6	0	0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL	50	14a	28,0	0	0	1b	2,0	2b	4,0	1b	2,0

Letras diferentes na linha: $p \leq 0,05$.

TABELA 2: Soroprevalência de anticorpos anti-*T.gondii*, detectados pela Reação de Imunofluorescência Indireta, em soros de canídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil.

Anti- <i>T.gondii</i> (títulos finais)											
ESPÉCIES	animais	1/50	%	1/100	%	1/200	%	1/400	%	1/800	%
<i>C. thous</i> (n=25)	25	5	20,0	3	12,0	0	0,0	0	0,0	1	4,0
<i>L. gymnocercus</i> (n=5)	5	0	0,0	3	60,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>S. venaticus</i> (n=6)	6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C. brachyurus</i> (n=14)	14	2	14,3	2	14,3	1	7,1	2	14,3	3	21,4
TOTAL	50	7	14,0	8	16,0	1	2,0	2	4,0	4	8,0

Das amostras provenientes de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), nove (36%) apresentaram sorologia positiva para *N. caninum* e nove (36%) para *T. gondii*, sendo que, dessas, duas (8%) apresentaram positividade para ambos os parasitos. Dentre os graxains-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*), três animais (60%) foram soropositivos para *N. caninum* e o mesmo número de animais foi soropositivo para *T. gondii*, sendo que apenas um animal (20%) foi soropositivo para ambos os protozoários. Soros de animais dessas espécies foram testados para presença de anticorpos anti-*N. caninum* por CÂNON-FRANCO *et al.* (2004) e as prevalências encontradas foram 41,6% para graxaim-do-campo e 26,6% em cachorros-do-mato. Outro estudo realizado no Brasil analisou soros provenientes de 48 lobos-guará de zoológicos e de vida livre e de dois cachorros-do-mato, não encontrando positividade na RIFI em nenhuma das amostras testadas (MELO *et al.*, 2002). No presente estudo, analisando-se as amostras de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), verificou-se prevalência de 28,6% (4/14) e de 71,4% (10/14) para anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*, respectivamente. Num estudo realizado com amostras de soro de 52 lobos-guará provenientes de vários zoológicos do Brasil e sete lobos-guará de vida livre, 44 (74.6%) foram soropositivos para *T. gondii* e cinco (8.5%) para *N. caninum*, sendo que as amostras dos animais de vida livre foram negativas para ambos os parasitos (VITALIANO *et al.*, 2004). Comparando-se os resultados encontrados nos dois estudos, as prevalências para *T. gondii* foram semelhantes, porém a prevalência encontrada no presente estudo pra *N. caninum* em lobos-guará foi maior, o que pode significar um aumento na dispersão do protozoário no período entre a realização das pesquisas.

Os valores de soroprevalência encontrados não apresentaram diferença estatística

entre os parasitos testados ($p \leq 0,05$). Também não houve diferença significativa entre as prevalências para anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* entre as diferentes espécies de canídeos. No entanto, a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em lobo-guará apresenta uma tendência a ser significativamente maior que a prevalência em cachorro-vinagre, afirmando-se com 93,5% de segurança ou considerando-se $p \leq 0,07$. Possivelmente com um número maior de amostras, essa adaptação não seria necessária.

Os títulos finais para *N. caninum* variaram entre 1:50 e 1:3200. A maior parte dos animais soropositivos para *N. caninum* apresentou título final de 1:50 (28%), abrangendo um número de amostras significativamente maior que as outras titulações (TABELA 1). Para *T. gondii*, os títulos finais variaram entre 1:50 e 1:800, sem apresentar diferença estatística entre o número de amostras em cada titulação, sendo que a maior parte apresentou títulos entre 1:50 e 1:100 (30%) (TABELA 2). A relação entre o título final e a apresentação clínica da doença ainda não está completamente elucidada. Em um estudo realizado com cães domésticos, a titulação variou entre 1:50 e 1:3200 em animais com sinais clínicos de neosporose (DUBEY *et al.*, 1998). Entretanto, já foram observados títulos de 1:200 e 1:800 em cães clinicamente sadios (REICHEL, 1998; BARBER e TREES, 1996). Ainda não foram realizadas pesquisas correlacionando resultados sorológicos e estado clínico em canídeos selvagens.

Os resultados de acordo com o local onde se encontravam os animais estão dispostos na TABELA 3. Foram coletadas amostras de animais cativos em diferentes estados brasileiros. Agrupando-se os três locais de coleta do estado do Paraná, tem-se 27 (54%) soros de animais desse estado. Desses, 11 (40,7%) foram positivos para *N. caninum* e oito (29,6%) para *T. gondii*. Do total de amostras dos outros estados (Santa Catarina, Rio de Janeiro e Distrito Federal), a prevalência encontrada para *N. caninum* e *T. gondii* foi 30,4% (7/23) e 56,5% (13/23), respectivamente. Para análise estatística em relação ao local de residência dos animais, foram comparados apenas dois grupos: animais do Paraná e animais de outros estados. Isto porque o número de amostras provenientes de cada estado não era equilibrado. No entanto, não foi verificada diferença significativa entre as prevalências desses grupos para nenhum dos protozoários testados. Estudos epidemiológicos da neosporose bovina relatam taxas de prevalência da neosporose de 7,6 a 30,13% nas diferentes regiões brasileiras, sendo de 30,0% em Pernambuco, entre 10,49 e 14,09% na Bahia, 7,7 a 8% no Mato Grosso do Sul, 7,7% em Minas Gerais, 7,6 a 30,13% em São Paulo, 11,69% no Paraná e 23,8% no Rio de Janeiro (ALMEIDA, 2004). Ragozo *et al.* (2003) avaliou a ocorrência de anticorpos para *N.*

caninum em soros bovinos de seis Estados brasileiros e encontrou soropositividade de 23,6%, com aumento deste índice nos bovinos com idade superior a 24 meses, e dentre os Estados, o Rio de Janeiro apresentou a menor (14,7%) e Minas Gerais a maior (29,0%) porcentagem de animais reagentes. Com relação à aptidão animal, observou-se maior ocorrência nos bovinos de leite (26,2%) quando comparados com os de corte (19,1%), e os Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul apresentaram os maiores valores de ocorrência nos bovinos de corte. O primeiro relato de isolamento de *N. caninum* num feto bovino no Brasil foi realizado no Paraná por LOCATELLI-DITTRICH *et al.* em 2004. Essas pesquisas demonstram que o *Neospora caninum* está amplamente distribuído no Brasil.

TABELA 3: Soroprevalência de *N. caninum* e *T. gondii* em canídeos selvagens cativos no Brasil, segundo o local de residência.

LOCAL	animais	Soropositivos		Soropositivos		Soropositivos	
		<i>N. caninum</i>	%	<i>T. gondii</i>	%	para ambos	%
Zoo Curitiba-PR (n=6)	6	1	16,7	5	83,3	1	16,7
Zoo Pomerode-SC (n=7)	7	2	28,6	3	42,9	2	28,6
Zoo Brasília-DF (n=15)	15	5	33,3	9	60,0	3	20,0
Rio Zoo-RJ (n=1)	1	0	0,0	1	100,0	0	0,0
CETAS- PUC-PR (n=5)	5	3	60,0	2	40,0	1	20,0
*C. C.-PR (n=16)	16	7	43,8	1	6,3	0	0,0
TOTAL	50	18	36,0	20	40,0	7	14,0

* Criatório Conservacionista

Não há registro a respeito da origem de todos os animais que participaram do estudo. Sabe-se que 14 (28%) animais vieram de vida livre e 15 (30%) nasceram em cativeiro. Dos animais que já tiveram contato com seu habitat natural, sete (50%) apresentaram soropositividade para *N. caninum* e nove (64,3%) para *T. gondii*. Dos animais nascidos em cativeiro, a prevalência para anticorpos anti-*N. caninum* encontrada foi 40% (6/15) e 20% (3/15) para anticorpos anti-*T. gondii*. Levando-se em consideração o local de origem, não houve diferença significativa entre as prevalências encontradas, bem como entre os parasitos. Como os animais nascidos em cativeiro nunca tiveram acesso a restos de aborto ou carcaças expostas a campo, a possível fonte de contaminação desses animais é carne crua. O fornecimento de carne bovina sem cozimento para

animais carnívoros é uma prática comum em zoológicos e criadouros. Relatos a respeito da ocorrência e prevalência de cistos de *N. caninum* ou *T. gondii* em amostras de carne bovina direcionadas ao consumo no Brasil não foram encontrados, todavia, os resultados de soropositividade no gado bovino apresentados anteriormente alertam para a possibilidade de comprometimento dos subprodutos destes animais. Uma pesquisa realizada no Rio Grande do Sul com fragmentos de carne suína encontrou prevalência de cistos de *T. gondii* de 34% em amostras de diafragma e 66% em amostras de língua (BELFORT-NETO, 2007). Os cistos são formas de resistência de alguns parasitos, portanto, não são de fácil inativação nos tecidos dos hospedeiros. Estudos comprovam que cistos de *T. gondii* tornam-se inviáveis quando submetidos a uma pressão de no mínimo 300 MPa (LINDSAY *et al.*, 2006) ou a temperaturas de 58°C por 9,5 minutos ou 61°C por períodos acima de 3,6 minutos (DUBEY *et al.*, 1990). A adoção de práticas como o fornecimento de carnes cozidas aos animais cativos poderia diminuir a prevalência de *N. caninum* e *T. gondii* nos zoológicos e criadouros.

4 CONCLUSÕES

Foi encontrada soropositividade para *N. caninum* (36%) e para *T. gondii* (40%) em um número expressivo de amostras, o que demonstra que esses parasitos estão circulando entre várias espécies de canídeos selvagens e em diferentes estados do Brasil.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.A.O. Epidemiologia de *Neospora caninum*. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simposio Latino-Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 13, suplemento 1, p. 37 – 40, 2004.

ALMERIA, S.; FERRER, D.; PABÓN, M.; CASTELLÀ, J. MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. Veterinary Parasitology, v. 107, p. 287 – 294, 2002.

BARBER, J.S.; TREES, A.J. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. Veterinary Record, v. 139, p. 439 – 443, 1996.

BELFORT-NETO, R.; NUSSENBLATT, V.; RIZZO, L.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; NUSSENBLATT, R.; KHAN, A.; SIBLEY, L.D.; BELFORT-Jr, R. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. In: Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 79, n. 1, p. 111 – 114, 2007.

CÂNON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. Veterinary Parasitology, v. 123, p. 275 – 277, 2004.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTSSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRÝ, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. International Journal for Parasitology, v. 32, p. 929 - 946, 2002.

DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. Journal of Comparative Pathology, v. 134, n. 4, p. 267 – 289, 2006.

DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDDELL, S.; SPEER, C.A.; KWOW, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p. 1293 – 1304, 1998.

DUBEY, J.P.; KOTULA, A.W.; SHARAR, A.; ANDREWS, C.D.; LINDSAY, D.S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *Journal of Parasitology*, v.76, n.2, p. 201 – 204, 1990.

GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal of Parasitology*, v. 88, p.1159 – 1163, 2002.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 34, 159 – 161, 2004.

HIGA, A. C.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; DOMINGUES, L. M.; MALHEIROS, E. B. Evaluation of cross-reactivity of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antigens in dogs sera. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.9, n.2, p. 91 – 95, 2000.

JAKUBEK, E-B; FARKAS, R.; PALFI, P.; MATTSSON, J.G. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Hungarian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, v.144, p. 39 – 44, 2007.

LINDSAY, D.S.; COLLINS, M.V.; HOLLIMAN, D.; FLICK, G.J.; DUBEY, J.P. Effects of high-pressure processing on *Toxoplasma gondii* tissue cysts in ground pork. *Journal of Parasitology*, v.92, n.1, p. 195 – 196, 2006.

LINDSAY, D.S.; KELLY, E.J.; McKOWN, R.D.; STEIN, F.J.; PLOZER, J.; HERMAN, J.; BLAGBURN, B.L.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*, v. 82, p. 657 – 659, 1996.

LINDSAY, D.S.; WESTON, J.L.; LITTLE, S.E. Short communication: Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). *Veterinary Parasitology*, v. 97, p.159–164, 2001.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; DER VINNE, R.V.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.3, p. 103-109, 2004.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p.1473 – 1478, 1998.

MELO, C.B.; LEITE, R.C.; LEITE, F.S.C.; LEITE, R.C. Serological surveillance on South American wild canids for *Neospora caninum*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, vol.54, n.4, 2002.

MIKICH, S.B.; BERNILS, R.S. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Editora: Instituto Ambiental do Paraná, 2004, 763 p.

MOORE, D.P. Neosporosis in South America. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p. 87 – 97, 2005.

RAGOZO, A.M.A.; PAULA, V.S.O.; SOUZA, S.L.P.; BERGAMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.12, n.1, p. 33 - 37, 2003.

REICHEL, M.P.; THORTON, R.N.; MORGAN, P.L.; MILLS, R.J.M.; SCHARES, G. Neosporosis in a pup. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 46, p. 106 – 110, 1998.

SEDLÁK, K.; BÁRTOVÁ, E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*, v.136, p. 223- 231, 2006.

SILVA, D.A.; VITALIANO, S.N.; MINEO, T.W.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). Journal of Parasitology, v.95, n.5, p. 1212 – 1216, 2005.

VIANNA, M.C.B.; SREEKUMAR, C.; MISKA, K.B.; HILL, D.E.; DUBEY, J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Veterinary Parasitology, v. 129, p. 253 – 257, 2005.

VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. Veterinary Parasitology, v. 122, p. 253 – 260, 2004.

WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GLABER-EDUARDO, C.; PROSL, H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. Veterinary Parasitology, v. 128, p. 189 – 193, 2005.

WOLFE, A.; HOGAN, S.; MAGUIRE, D.; FITZPATRICK, C.; MULCAHY, G.; VAUGHAN, L.; WALL, D.; HAYDEN, T. J. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. Veterinary Record, v.149, p. 759 – 763, 2001.

CAPÍTULO II

PESQUISA E DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Neospora caninum* NAS FEZES DE TRÊS ESPÉCIES DE CANÍDEOS SELVAGENS NATIVAS DO BRASIL

Investigation and detection of Neospora caninum oocysts in faeces of three species of Brazilian wild canids

ABSTRACT

The participation of wild animals in neosporosis epidemiology has been the subject of several investigations. It is proved that *Neospora caninum* is present in wild species by serological, parasitological and molecular diagnosis. The aim of this study was to determine the presence and occurrence of *N. caninum* in faeces of Brazilian wild canids. It was collected 40 faecal samples from three species: crab-eating dogs (*Cerdocyon thous*), bush dogs (*Speothos venaticus*) and maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*), from the Pomerode Zoo, Curitiba Zoo and a sanctuary from Parana state. Samples were submitted to coproparasitological test to verify the presence of oocysts, and DNA was extracted from faeces to identification of *N. caninum* by polimerase chain reaction (PCR). It was found oocysts morphologically related to *N. caninum* in 7.5% (3/40) samples and it was found *N. caninum* DNA in faeces of a maned wolf from Curitiba Zoo. This is the first report of research and occurrence of *N. caninum* oocysts in faeces of a Brazilian wild canid.

KEY-WORDS: neosporosis, oocyst, maned wolf, canids.

RESUMO

A participação de animais selvagens na epidemiologia da neosporose tem sido objeto de diversas pesquisas. Já foi comprovado que o protozoário *Neospora caninum* circula dentre espécies silvestres por meio de testes sorológicos, parasitológicos e moleculares. Com objetivo de determinar a presença e ocorrência de *N. caninum* nas fezes de canídeos selvagens nativos do Brasil, foram coletadas 40 amostras de fezes pertencentes a três espécies de canídeos: cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) e lobos-guarás (*Chrisocyon brachyurus*), residentes de três cativeiros (Zoológico de Pomerode – SC, Zoológico de Curitiba – PR e um Criadouro Conservacionista). As amostras foram submetidas a exame coproparasitológico para pesquisa de oocistos e foi extraído DNA das fezes para identificação de *N. caninum* por PCR. Foram encontrados oocistos morfolologicamente semelhantes aos de *N. caninum* em 7,5% (3/40) amostras e foi encontrado DNA de *N. caninum* nas fezes de um lobo-guará, residente do Zoológico de Curitiba – PR. Este é o primeiro relato de pesquisa e presença de oocistos de *N. caninum* em fezes de canídeos selvagens de espécies nativas do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: neosporose, oocisto, lobo-guará, canídeos.

1 INTRODUÇÃO

Neospora caninum, protozoário Apicomplexa, é o agente causador da neosporose, doença que causa altas taxas de aborto nos rebanhos bovinos no mundo. Seus hospedeiros definitivos são os cães domésticos e os coiotes (*Canis latrans*) (McALLISTER *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004). Outras espécies de animais selvagens também participam do ciclo do parasita como hospedeiros intermediários, dentre os quais destacam-se espécies de cervídeos, camelídeos, bovídeos, roedores, mamíferos marinhos, aves e outros canídeos (GONDIM, 2006; DUBEY *et al.*, 2007). Um ciclo silvestre da neosporose foi identificado nos Estados Unidos, com a participação dos coiotes e de veados-da-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*). Os coiotes também participam da manutenção da doença nos rebanhos domésticos, pois observou-se que a soroprevalência de *N. caninum* no gado era maior em fazendas onde foi havia a presença de coiotes nas proximidades (BARLING *et al.*, 2000).

No Brasil, pesquisas de soroprevalência de *N. caninum* em canídeos selvagens demonstram que o protozoário está circulando entre essas espécies (CÂNON-FRANCO *et al.*, 2004; VITALIANO *et al.*, 2004). Inexistem até o momento dados a respeito de pesquisas de oocistos de *N. caninum* em canídeos selvagens no Brasil.

Devido à proximidade filogenética, acredita-se que outras espécies de canídeos possam atuar como hospedeiros definitivos de *N. caninum*. Este estudo objetiva determinar a presença e ocorrência de oocistos de *N. caninum* nas fezes de canídeos selvagens nativos do Brasil, verificando a possibilidade de alguma dessas espécies participarem de forma ativa no ciclo da neosporose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e espécies:

Foram coletadas amostras de fezes de 29 canídeos selvagens de três espécies: 16 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), seis cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) e sete lobos-guarás (*Chrisocyon brachyurus*).

2.2 Procedência:

Os animais eram residentes de três cativeiros diferentes: Zoológico de Pomerode – SC, Zoológico de Curitiba – PR e Criadouro Conservacionista Luciano Sabóia, situado no município de Campina Grande do Sul, Região Metropolitana de Curitiba – PR. Todos os animais estavam clinicamente saudáveis.

2.3 Amostras:

As amostras de fezes foram coletadas do solo e as coletas foram repetidas duas a quatro vezes, com intervalos de sete a 15 dias, totalizando 40 amostras. As amostras foram identificadas com números de 01 a 40, seguidas de letras maiúsculas com as iniciais dos nomes vulgares das espécies e de números referentes aos animais (TABELA 1).

Como alguns animais estavam dispostos em recintos coletivos, não foi possível individualizar algumas amostras. No entanto, em se tratando de animais selvagens, a coleta de fezes diretamente da ampola retal torna-se inviável sem que os animais estejam física ou quimicamente contidos.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório.

2.4 Exame coproparasitológico:

O método Sheather (LEVINE e IVENS, 1965), baseado no princípio da centrífugo-flutuação em solução saturada de açúcar, foi realizado para pesquisa dos oocistos de protozoários nas fezes.

Dividiu-se o sobrenadante em duas partes, sendo uma para observação e pesquisa de oocistos com auxílio de microscópio óptico e outra para armazenamento em microtubos e congelamento para posterior análise molecular.

2.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

A Reação em Cadeia da Polimerase foi utilizada para caracterizar os oocistos dos

protozoários obtidos das fezes dos canídeos. Foram realizadas as etapas de extração do DNA e da PCR.

2.5.1 Extração do DNA:

A extração do DNA dos oocistos foi realizada pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico modificada (ANEXO 1). Foram aferidas as densidades ópticas e a pureza das amostras extraídas em um fotômetro, modelo WPA – UV 1101 (Biotech Photometer®).

2.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

O protocolo utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR) foi o descrito por Yamage e colaboradores (1996) para *Neospora caninum* e os componentes estão descritos no QUADRO 1. Foram preparadas reações de 30 µl, adicionando-se 3 µl de DNA em cada. O controle positivo foi o DNA de amostras da cepa de *N. caninum* NC1, de cultivo celular. Como controle negativo, utilizou-se água ultrapura.

QUADRO 1: Componentes da PCR para amplificação do DNA de *N. caninum*:

Tampão para PCR (10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8,3)	1x
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	1,5 mM
dNTPs	0,8 mM
iniciador Np6 (CAGTCAACCTACGTCTTCT)	1 µM
iniciador Np21 (GTGCGTCCAATCCTGTAAC)	1 µM
Taq Polimerase	2 U

A reação para amplificação dos DNAs foi conduzida em Termociclador (Mastercycler Gradient Eppendorf®) com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 3,5 minutos a 74°C, e 72°C por 5 minutos para extensão final.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Como corante para visualização da migração das moléculas de DNA no gel, utilizou-se azul de bromofenol.

O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador, sob luz ultravioleta. As imagens dos géis foram capturadas por um sistema de fotodocumentação modelo DP-001 FDC (Vilber Lourmat®).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Exames coproparasitológicos:

Foram encontrados oocistos semelhantes aos oocistos de *Neospora caninum* em 3 (7,5%) amostras de fezes: na amostra de um lobo-guará (08-L2), pertencente ao Zoológico de Pomerode, nas fezes de cachorros-do-mato (09-C1), de recinto coletivo deste mesmo Zoológico e nas fezes de lobos-guarás do Zoológico de Curitiba (recinto de L5 e L6, amostra 30). Foi encontrado apenas um oocisto em cada uma das lâminas avaliadas. Os resultados estão apresentados na TABELA 1.

O oocisto não esporulado encontrado apresentava forma sub-esférica, com um esporonte central, com diâmetro de aproximadamente 11 μm (FIGURA 1). Os oocistos de *N. caninum* possuem forma esférica a subesférica, com comprimento variando de 10,6 μm a 12,4 μm e largura de 10,6 μm a 12 μm . Possuem dois esporocistos com esporozoítos no interior, e não apresentam micrópilo na parede (LINDSAY *et al.*, 1999).



FIGURA 1: Oocisto encontrado nas fezes de um lobo-guará (*Chrisocyon brachyurus*) do Zoológico de Curitiba (amostra 30).

Existem poucos relatos na literatura a respeito de oocistos de *N. caninum* eliminados por cães naturalmente infectados, sendo um na Argentina, um na República Checa, um no Reino Unido, um na Nova Zelândia e um na Alemanha (DUBEY *et al.*, 2007).

TABELA 1: Resultados da pesquisa de oocistos e da análise por PCR para *Neospora caninum* dos DNAs extraídos de amostras de fezes de canídeos selvagens cativos. Curitiba, 2008.

AMOSTRAS/LOCAL	DATA DA COLETA	EXAME MICROSCÓPICO	PCR
01 – C 1/POMERODE	10/02/2008	negativo	negativo
02 – L 2/POMERODE	10/02/2008	negativo	2 bandas
03 – V 10/SABÓIA	09/02/2008	negativo	negativo
04 – L 4/ZOO CTBA	25/02/2008	negativo	banda M
05 – L 5/ZOO CTBA	25/02/2008	negativo	banda M
06 – L 6/ZOO CTBA	25/02/2008	negativo	banda M
07 – L 3/POMERODE	08/03/2008	negativo	2 bandas
08 – L 2/POMERODE	08/03/2008	presença de oocistos	negativo
09 – C 1/POMERODE	08/03/2008	presença de oocistos	banda M
10 – C 11/SABÓIA	14/02/2008	negativo	3 bandas
11 – C 12/SABÓIA	08/03/2008	negativo	negativo
12 – V 10/SABÓIA	08/03/2008	negativo	negativo
13 – L 7/ZOO CTBA	10/03/2008	negativo	negativo
14 – L 4/ZOO CTBA	10/03/2008	negativo	3 bandas
15- V 10/SABÓIA	22/03/2008	negativo	3 bandas
16- C 11/SABÓIA	22/03/2008	negativo	negativo
17- C 12/SABÓIA	22/03/2008	negativo	negativo
18 – L 6/ZOO CTBA	24/03/2008	negativo	Positivo para <i>N. caninum</i>
19 – L 5 e 6/ZOO	24/03/2008	negativo	banda M
20 – C 8/ZOO CTBA	24/03/2008	negativo	negativo
21 – L 4/ZOO CTBA	24/03/2008	negativo	negativo
22 – L 7/ZOO CTBA	24/03/2008	negativo	negativo
23 – C 9/ZOO CTBA	24/03/2008	negativo	negativo
24 – C 9/ZOO CTBA	01/04/2008	negativo	banda M
25 – C 8/ZOO CTBA	01/04/2008	negativo	banda M
26 – C 12/SABÓIA	16/04/2008	negativo	banda M
27 – V 10/SABÓIA	16/04/2008	negativo	banda M
28 – C 8/ ZOO CTBA	25/04/2008	negativo	banda M
29 – C 9/ZOO CTBA	25/04/2008	negativo	banda M
30 – L 5 e 6/ZOO CTBA	25/04/2008	presença de oocistos	banda M
31 – L 7/ZOO CTBA	25/04/2008	negativo	banda M
32– L 4/ZOO CTBA	25/04/2008	negativo	banda M
33 – C 11/SABÓIA	05/05/2008	negativo	negativo
34 – V 10/SABÓIA	05/05/2008	negativo	negativo
35 – C 9/ZOO CTBA	06/05/2008	negativo	negativo
36 – C 8/ZOO CTBA	06/05/2008	negativo	negativo
37 – L 4/ZOO CTBA	06/05/2008	negativo	negativo
38 – C 1/POMERODE	07/05/2008	negativo	negativo
39 – L 2/POMERODE	07/05/2008	negativo	negativo
40 – C 1/POMERODE	07/05/2008	negativo	banda G

C: Cachorro-do-mato; L: Lobo-guará; V: Cachorro-vinagre; banda M: aprox. 400pb; banda G: aprox. 800pb

O primeiro isolamento de oocistos de *N. caninum* de um cão naturalmente infectados foi realizado por Basso e colaboradores (2001). O cão apresentava fezes amolecidas e havia consumido carne sem cozimento. Foram verificados oocistos no

exame coproparasitológico e o DNA extraído desses oocistos foram submetido à PCR, resultando em um amplificado de 328 pb, compatível com *N. caninum*. O número de oocistos presentes nas fezes não foi determinado, mas era presumivelmente baixo.

Com objetivo de determinar a prevalência de *N. caninum* em coiotes em uma região no Canadá, foram coletadas fezes diretamente da ampola retal de 185 carcaças de coiotes recém-abatidas e apenas 2 (1,1%) amostras apresentaram oocistos de *N. caninum* (WAPENAAR *et al.*, 2006).

Diversos fatores podem influenciar na eliminação de oocistos nas fezes, como quantidade de taquizoítos ingerida, tipo de tecido contaminado que foi consumido, idade do hospedeiro, hospedeiro intermediário que transmitiu o parasito (DUBEY *et al.*, 2007). Cães imunodeprimidos parecem eliminar mais oocistos que animais imunocompetentes (LINDSAY *et al.*, 1999a).

O período de eliminação dos oocistos é bastante variável e pode começar cinco dias ou mais após a infecção e durar um ou vários dias. No estudo que comprovou que os cães domésticos são hospedeiros definitivos do *N. caninum*, quatro cães receberam tecidos de camundongos experimentalmente infectados com o protozoário e três deles excretaram oocistos compatíveis com *N. caninum* nas fezes. A eliminação dos oocistos teve início no oitavo dia após a infecção e durou dez dias aproximadamente e todos os animais apresentaram anticorpos anti-*N.caninum*. (McALLISTER *et al.*, 1998). Em outra pesquisa, cães que receberam fragmentos de placenta bovina contaminada com *N. caninum* eliminaram oocistos por até 30 dias após a infecção e não apresentaram anticorpos contra o parasito no período do estudo (DIJKSTRA *et al.*, 2001).

3.2 Caracterização dos oocistos de protozoários pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

Na análise molecular, a amostra 18-L6 de DNA amplificado apresentou uma banda de 328 pb, tamanho esperado para *Neospora caninum* e equivalente ao revelado pelo controle positivo (FIGURA 2). Não foram detectados oocistos na observação microscópica desta amostra demonstrando a baixa sensibilidade deste exame em casos como este, em que o número de oocistos eliminados pelos hospedeiros é pequeno. Trata-se do primeiro relato de presença de oocistos de *N. caninum* em fezes de canídeos selvagens de espécies nativas do Brasil.

Do total de 40 amostras, 15 não apresentaram nenhuma banda no gel de

eletroforese.

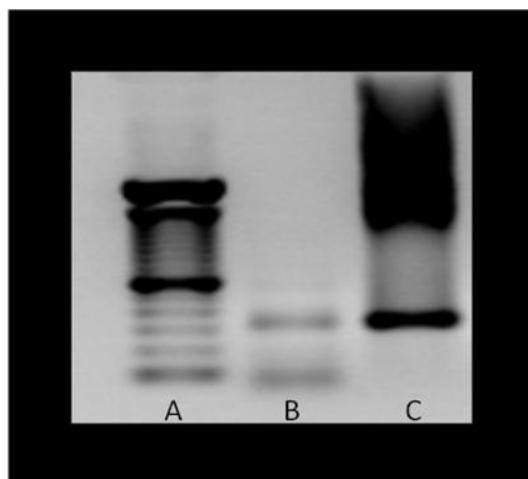


FIGURA 2: Eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Amplificação de fragmentos de DNA extraídos de fezes de canídeos selvagens. Coluna A: marcador de peso molecular 100pb; Coluna B: amostra 18 - L6, positiva para *Neospora caninum*; Coluna C: controle positivo de *N. caninum* (328pb).

Duas amostras que apresentaram oocistos no exame microscópico (09 e 30) revelaram uma banda com aproximadamente 400 pb (banda M) após a amplificação de DNA (FIGURA 3). A terceira amostra que apresentou oocistos na microscopia (08-L2) apresentou resultado negativo na PCR.

Bandas de 400 pb também foram observadas em outras 14 amostras, sendo sete provenientes de cachorros-do-mato, duas de cachorros-vinagre e cinco de outros lobos-guarás.

Uma banda adicional de aproximadamente 370 pb foi encontrada no DNA amplificado dos oocistos encontrados nas fezes de um cão de um ano de idade da República Checa (SLAPETA, *et al.*, 2002). Os iniciadores utilizados nesse estudo também foram Np6 e Np21. Uma outra pesquisa que utilizou o mesmo par de *primers* encontrou uma banda de aproximadamente 900 pb, além da banda de 328 pb, revelada por uma cepa de referência de *N. caninum* NC2 (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004). Técnicas de biologia molecular como PCR-RFLP, PCR-SSCP e seqüenciamento revelaram polimorfismo entre amostras de DNA de *H. heydorni* de oocistos eliminados por cães dos Estados Unidos, Argentina e Brasil, no entanto as diferenças encontradas não demonstraram relação geográfica (SREEKUMAR *et al.*, 2004). Isolados de *H. heydorni* de raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) e de cães constituíram populações geneticamente distintas, de acordo com o seqüenciamento realizado por Mohammed e colaboradores

(2003). Estes resultados são fortes indicadores de que as cepas de *N. caninum* que circulam entre os canídeos selvagens possam ser diferentes das veiculadas por cães domésticos.

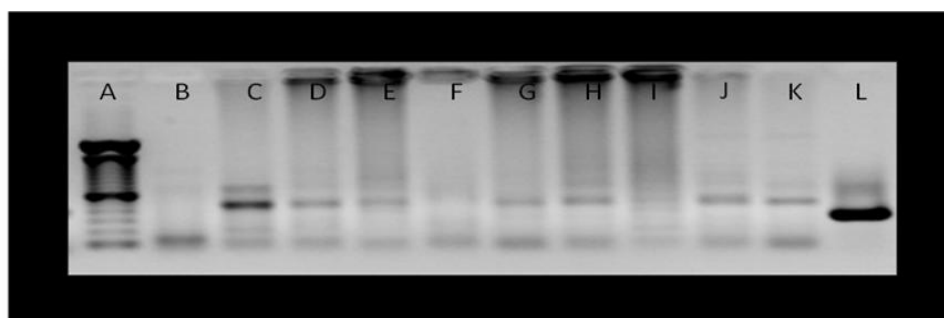


FIGURA 3: Eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Amplificação de fragmentos de DNA extraídos de fezes de canídeos selvagens. Coluna A: marcador de peso molecular 100pb; Colunas C, D, E, G, H, J, K: banda M (aproximadamente 400pb); Coluna L: controle positivo de *Neospora caninum* (328pb).

Oocistos de *Neospora caninum* são morfologicamente indistinguíveis dos de *Hammondia heydorni* (SCHARES *et al.*, 2001), um coccídio da família *Toxoplasmatidae* que também é parasito de canídeos mas não é patogênico. Por esse motivo, a técnica da reação em cadeia da polimerase é de grande importância para a correta identificação de oocistos de *N. caninum*. Os iniciadores Np6 e Np21, que amplificam uma região do gene Nc-5, são específicos para diagnóstico de *N. caninum*, pois as seqüências desses iniciadores não são encontradas no genoma de *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis miescheliana*, *Sarcocystis moulei*, *Sarcocystis tenella* e *Hammondia hammondi* (YAMAGE *et al.*, 1996). Essa especificidade é importante porque existe a possibilidade de infecções mistas. A região ITS1 rDNA é considerada a seqüência de escolha para diferenciar *N. caninum* de *Neospora huguesi*, *Hammondia heydorni* e *Toxoplasma gondii* (SLAPETA *et al.*, 2002).

A amostra de fezes positiva para *N. caninum* no presente relato pertencia a uma fêmea (L6) de lobo-guará do Zoológico de Curitiba, que nasceu em vida livre e foi recebida no Zoológico em 1999, após ser encontrada ferida na região dos Campos Gerais, estado do Paraná. No recinto desta fêmea também reside um macho da mesma espécie (L5), mas as amostras deste animal não foram positivas na PCR para *N. caninum*. Não foram detectados anticorpos anti-*N.caninum* pela reação de imunofluorescência indireta no soro de L6. Outros pesquisadores também não detectaram sorologia positiva para *N. caninum* em cães que estavam excretando oocistos do

protozoário (LINDSAY *et al.*, 1999a; WAPENAAR *et al.*, 2006; DIJKSTRA *et al.*, 2001).

A provável fonte de infecção do lobo-guará L6 foi o consumo de carne sem cozimento, portanto não é possível determinar quando o animal foi infectado. Por se tratar de um animal que não nasceu em cativeiro, ainda existe a possibilidade de ele ter sido infectado em vida livre.

Os coiotes (*Canis latrans*) foram identificados como hospedeiros definitivos de *N. caninum* em um estudo realizado nos Estados Unidos. Quatro coiotes filhotes foram alimentados com tecidos bovinos experimentalmente infectados e um deles eliminou oocistos em suas fezes. Os oocistos foram reconhecidos como sendo de *N. caninum* baseado em características morfológicas e moleculares. Os oocistos também foram submetidos à PCR para *H. Heydorni* e apresentaram resultado negativo (GONDIM *et al.*, 2004).

A produção total de oocistos pelos coiotes detectada foi de 500 oocistos em dois dias, o que demonstra que os coiotes podem não ser hospedeiros definitivos eficientes para *N. caninum* (GONDIM *et al.*, 2004). Por outro lado, verificou-se que 300 oocistos são suficientes para infectar o gado, demonstrando a importância da transmissão horizontal para manutenção da neosporose (GONDIM *et al.*, 2002). A transmissão horizontal ocorre por meio da ingestão pelos hospedeiros intermediários de oocistos esporulados no ambiente. Os oocistos esporulam em menos de 24 horas, mas não se sabe quanto tempo eles sobrevivem no ambiente (DUBEY *et al.*, 2007). Oocistos armazenados por 46 meses em solução de ácido sulfúrico 2% a 4°C não infectaram gerbilos durante os dois meses de estudo (UZEDA *et al.*, 2007), no entanto oocistos armazenados nas mesmas condições por 108 dias não perderam o poder de infecção (GONDIM *et al.*, 2004a).

Foram realizadas quatro coletas de fezes da fêmea L6, todavia só foi encontrado resultado positivo por PCR para *N. caninum* em uma amostra. Gondim e colaboradores (2002) alimentaram cães com cérebros de camundongos e com tecidos bovinos experimentalmente contaminados com *N. caninum* e perceberam que os cães que consumiram tecidos bovinos eliminaram uma quantidade significativamente maior de oocistos que o outro grupo. Outra importante conclusão deste estudo foi que o DNA do protozoário não foi detectado pela PCR em amostras de fezes com menos de 5.700 oocistos (GONDIM *et al.*, 2002). Outras técnicas de biologia molecular, como a nested-PCR, podem aumentar a sensibilidade para o diagnóstico do *N. caninum*. (BARRATT *et al.*, 2008; BASSO *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos, cérebros de cervídeos contaminados com *N. caninum* foram

oferecidos a quatro cães e dois deles eliminaram oocistos nas fezes de sete a 14 dias após a infecção. Esta pesquisa demonstra a possibilidade de transmissão entre animais selvagens e domésticos (GONDIM *et al.*, 2004b), demonstrando que o ciclo silvestre da neosporose pode interferir também na manutenção da doença entre os animais domésticos.

As tentativas de conseguir identificar outros hospedeiros definitivos do *N. caninum* ainda não tiveram sucesso. Treze animais de três diferentes espécies de mustelídeos (*Mustela erminea*, *Mustela frenata*, *Mustela putorius*), animais de hábitos alimentares carnívoros, receberam tecidos de camundongos infectados com *N. caninum* e não eliminaram oocistos nas fezes. Camundongos que consumiram as fezes desses animais não apresentaram anticorpos anti-*N. caninum* e não foi encontrado DNA do parasito em seus tecidos (McALLISTER *et al.*, 1999). O autor deste estudo sugere que outras espécies de carnívoros, além dos canídeos, ainda sejam testados quanto ao potencial de participação no ciclo da neosporose, como Procionídeos (ex: quatis), Pinípedes (ex: focas, leões-marinhos) e Ursídeos (ex: ursos). Raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) foram identificadas como hospedeiros definitivos de *Hammondia heydorni* (SCHARES *et al.*, 2001a) e intermediários naturais de *N. caninum* (ALMERIA *et al.*, 2002).

Shares e colaboradores (2005) encontraram oocistos de *Toxoplasma gondii* e de *Hammondia hammondi* em quatro cães na Alemanha. Ambos os protozoários têm os felídeos como hospedeiros definitivos, portanto, acredita-se que os resultados obtidos foram decorrente de coprofagia. Como no presente estudo foi encontrado apenas uma amostra positiva para *N. caninum*, ainda não é possível afirmar que os lobos-guarás são hospedeiros definitivos deste parasito, já que também pode ter ocorrido coprofagia. Foram encontrados oocistos de *N. caninum* nas fezes de duas das 271 raposas-vermelhas (*Vulpes vulpes*) pesquisadas no Canadá (WAPENAAR *et al.*, 2006). Como a prevalência encontrada foi muito baixa e a quantidade de oocistos observada foi pequena, os pesquisadores não consideraram o estudo como descoberta de uma nova espécie de hospedeiro definitivo de *N. caninum*. Em um outro trabalho, canídeos selvagens desta mesma espécie não excretaram oocistos após ingerirem tecidos de cabras e ovelhas infectadas (SCHARES *et al.*, 2002). Entretanto, outros estudos com esse objetivo devem ser incentivados, com períodos longos de observação, porque sabe-se que a quantidade de oocistos eliminados é baixa de maneira geral e isso dificulta as pesquisas com esse enfoque.

4 CONCLUSÕES

- a) No exame coproparasitológico, 7,5% (3/40) amostras de fezes de canídeos selvagens apresentaram oocistos semelhantes aos de *N. caninum*.
- b) Na análise por PCR do DNA dos oocistos, 2,5% (1/40) foi identificado como *N. caninum*.
- c) No Paraná, oocistos morfologicamente semelhantes aos de *N. caninum* foram observados nas fezes de um lobo-guará (*Chrisocyon brachyurus*), demonstrando a presença do parasita em canídeos selvagens.
- d) A amplificação por PCR da sequência do DNA de oocisto eliminado por lobo-guará (*Chrisocyon brachyurus*), residente do Zoológico de Curitiba – PR, identificou o protozoário como pertencente a espécie *Neospora caninum*.
- e) Canídeos selvagens cativos nativos do Brasil eliminaram oocistos de *N. caninum*.
- f) Canídeos selvagens devem ser investigados quanto ao seu potencial de transmissão da neosporose e sua importância epidemiológica no ciclo desta protozoose.

5 PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados neste estudo ressaltaram a importância de continuar investigando espécies de canídeos selvagens quanto ao seu papel no ciclo da neosporose. O DNA de *N. caninum* encontrado nas fezes do lobo-guará L6 deverá ser seqüenciado para posterior comparação com cepas do protozoário isoladas de outros hospedeiros. Na tentativa de comprovar que animais da espécie *Chrisocyon brachyurus* são hospedeiros definitivos de *N. caninum*, este lobo-guará será acompanhado e suas fezes serão recolhidas por um período longo, aumentando assim a chance de observação de um número maior de oocistos, e permitindo a aplicação de outras provas nas amostras de DNAs extraídos, como PCR para *Hammondia heydorni* e provas biológicas em camundongos e gerbilos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABLÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, v.107, p. 287-294, 2002.

BARLING, K.S.; SHERMAN, M.; PETERSON, M.J.; THOMPSON, J.A.; McNEILL, J.W.; CRAIG, T.M.; ADAMS, L.G. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 217, p.1361-1365, 2000.

BARRATT, J.; AL QASSAB, S.; REICHEL, M.P.; ELLIS, J.T. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. *Molecular and Cellular Probes*, v. 22, p. 228 – 233, 2008.

BASSO, W.; SCHARES, S.; BARWALD, A.; HERRMANN, D.C.; CONRATHS, F.J.; PANTCHEV, N.; VRHOVEC, M.G.; SCHARES, G. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocysts isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Veterinary Parasitology*, 2008, no prelo.

BASSO, W.; VENTURINI, L.; VENTURINI, M.C.; HILL, D.E.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; DUBEY, J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology*, v. 87, p. 612 – 618, 2001.

CÂNON-FRANCO, W.A.; YAI, L.E.O.; SOUZA, S.L.P.; SANTOS, L.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.; ROSSI, F.W.; GOMES, A.A.B.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in two species of wild canids, *Lycalopex gymnocercus* and *Cerdocyon thous* from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 123, p. 275 – 277, 2004.

DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.J. WOUDA, W.; BARKEMA, H.W. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts afes ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*, v. 31, p. 747 – 752, 2001.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. Clinical Microbiology Reviews, v. 20, p. 323-367, 2007.

GONDIM, L.F.P. *Neospora caninum* in wildlife. Trends in Parasitology, v. 22, p. 247 – 252, 2006.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v. 34, 159 – 161, 2004.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; ANDERSON-SRPECHER, R.C.; BJORKMAN, C.; LOCK, T.F.; FIRKINS, L.D. GAO, L.; FISCHER, W.R. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. Journal of Parasitology, v. 90, p. 1394 – 1400, 2004a.

GONDIM, L.F.P.; McALLISTER, M.M.; MATEUS-PINILLA, N.E.; PITT, W.C.; MECH, L.D.; NELSON, M.E. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. Journal of Parasitology, v. 90, p. 1361 – 1365, 2004b.

GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. Journal of Parasitology, v. 88, p.1159 – 1163, 2002.

LEVINE, N.D.; IVENS, V. *Isospora* species in the dog. Journal of Parasitology, v. 51, p. 859 – 864, 1965.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; DUBEY, J.P. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. International Journal for Parasitology, v. 29, p. 1521 – 1523, 1999.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Veterinary Parasitology, v. 82, p. 327 – 333, 1999a.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; DER VINNE,

R.V.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.13, n.3, p. 103-109, 2004.

McALLISTER, M.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M.; JOLLEY, W.R.; TRANAS, J.D.; WILLIAMS, E.S.; LINDSAY, D.S.; BJÖRKMAN, C.; BELDEN, E.L. Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. International Journal for Parasitology, v. 29, p. 1531-1536, 1999.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, v. 28, p.1473 – 1478, 1998.

MOHAMMED, O.B.; DAVIES, A.J.; HUSSEIN, H.S.; DASZAK, P.; ELLIS, J.T. *Hammondia heydorni* from the Arabian mountain gazella and red fox in Saudi Arabia. Journal of Parasitology, v. 89, p. 535 – 539, 2003.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A.O.; BAUER, C.; CONRATHS, F.J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. International Journal for Parasitology, v. 35, p. 1525 – 1537, 2005.

SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; MEHLHORN, H.; GEUE, L.; PETERS, M.; CONRATHS, F.J. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. Parasitology research, v. 88, p. 44 – 52, 2002.

SCHARES, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; CONRATHS, F.J.; MEHLHORN, H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. Parasitology Research, v. 87, p. 808 - 816, 2001.

SCHARES, G.; WENZEL, U.; MULLER, T.; CONRATHS, F.J. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). International Journal for Parasitology, v. 31, p. 418 – 423, 2001a.

SLAPETA, J.R.; MODRY, D.; KYSELOVA, I.; HOREJS, R.; LUKES, J.; KOUDELA, B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Veterinary Parasitology*, v. 109, p. 157 – 167, 2002.

SREEKUMAR, C.; HILL, D.E.; MISKA, K.B.; ROSENTHAL, B.M.; VIANNA, M.C.B.; VENTURINI, L.; BASSO, W.; GENNARI, S.M.; LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P. *Hammondia heydorni*: evidence of genetic diversity among isolates from dogs. *Experimental Parasitology*, v. 107, p. 65 – 71, 2004.

UZEDA, R.S.; COSTA, K.S.; SANTOS, S.L.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; McALLISTER, M.M.; GONDIM, L.F.P. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. *Korean Journal of Parasitology*, v. 45, p. 295 – 299, 2007.

VITALIANO, S.N.; SILVA, D.A.O.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 122, p. 253 – 260, 2004.

WAPENAAR, W.; JENKINS, M.C.; O'HANDLEY, R.M.; BARKEMA, H.W. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *Journal of Parasitology*, v. 92, p. 1270 – 1274, 2006.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Parasitology*, v. 82, p. 272 – 279, 1996.

ANEXO 1

EXTRAÇÃO DE DNA DE OOCISTO

1 LISE E HOMOGENIZAÇÃO DA AMOSTRA:

- ◆ Homogeneizar as amostras em vortex, pipetar 1 ml do material em um tubo eppendorf de 2 ml e centrifugar a 10.000 rpm por 10 min.
- ◆ Descartar o sobrenadante. No material centrifugado, acrescentar 400ul de tampão de lise (TE) e homogeneizar. O volume final será de aproximadamente 500ul.
- ◆ Adicionar SDS a 1% do volume final e homogeneizar.
- ◆ Acrescentar proteinase K a 200ul/ml e incubar por 2h no mínimo em banho-maria a 55°C.

2 EXTRAÇÃO DO DNA

- ◆ Adicionar clorofórmio V/V e homogeneizar em vortex.
- ◆ Acrescentar 250ul de solução de precipitação protéica, homogeneizar em vortex (metade do volume do clorofórmio).
- ◆ Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min.
- ◆ Pipetar a fase aquosa para outro tubo de 2ml e acrescentar etanol absoluto resfriado duas vezes o volume pipetado. Incubar por 10 min em gelo.
- ◆ Centrifugar a 13.000 rpm por 15 min a 4 °C. Aparecerá um pellet, descartar o sobrenadante.

3 LAVAGEM DO DNA

- ◆ Lavar o sedimento com 300ul de etanol 70% resfriado.
- ◆ Centrifugar a 13.000 rpm por 5min a 4°C. Descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem e centrifugação.
- ◆ Secar o pellet por 10 min em temperatura ambiente.
- ◆ Ressuspender o pellet em 100 ul de água milliQ estéril. Incubar a 55°C por 20 min.
- ◆ Dosar o DNA e conservar a – 20°C.

4 SOLUÇÕES

4.1 Tampão de Lise:

- ◆ Tris HCl10 mM
- ◆ EDTA1 mM
- ◆ pH 8,0

4.2 Tampão de precipitação proteica:

- ◆ Acetato de potássio 5M6ml
- ◆ Ácido acético glacial1,1 ml
- ◆ Água destilada2,9 ml